

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭62-201581

⑫ Int.Cl.

識別記号

厅内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)9月5日

C 12 N 15/00
1/20
C 12 P 21/02
// A 61 K 39/395
(C 12 N 1/20
(C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
(C 12 R 1:19)

7115-4B
7115-4B
6712-4B
7252-4C

審査請求 未請求 発明の数 3 (全29頁)

⑭ 発明の名称 新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質の製造方法

⑮ 特願 昭61-43530

⑯ 出願 昭61(1986)2月28日

⑰ 発明者 堀 越 弘 敏 東京都練馬区桜台4-39-8

⑱ 発明者 工 藤 俊 章 東京都目黒区平野1-21-20-606

⑲ 発明者 北 井 一 男 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内

⑳ 発明者 中 村 聰 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社中央研究所内

㉑ 出願人 理化学研究所 和光市広沢2番1号

㉒ 出願人 帝人株式会社 大阪市東区南本町1丁目11番地

㉓ 代理人 弁理士 有我 軍一郎

明細書

記載のプラスミド。

1. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質の製造方法

(4) シグナルペプチドをコードするDNA領域が、好アルカリ性バチルス(Bacillus)No.170株の染色体DNA由来であることを特徴とする第1項記載のプラスミド。

2. 特許請求の範囲

(1) ヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質をコードするDNA領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有するDNA領域及びシグナルペプチドをコードするDNA領域を有するプラスミド。

(5) プラスミドpPS-Fcである第1項記載のプラスミド。

(2) ヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質をコードするDNA領域が、第1図に示されたアミノ酸配列の32番目(Thr)から254番目(Lys)までによって示されたポリペプチドをコードするDNA領域を少なくとも含むことを特徴とする第1項記載のプラスミド。

(6) ヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質をコードするDNA領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有するDNA領域及びシグナルペプチドをコードするDNA領域を有するプラスミドによって形質転換された組換え微生物細胞。

(3) プロモーター機能を有するDNA領域が、好アルカリ性バチルス(Bacillus)No.170株の染色体DNA由来であることを特徴とする第1項

(7) 該微生物細胞がエシェリヒア(Escherichia coli)に属することを特徴とする第6項記載の微生物細胞。

(8) 該微生物細胞がエシェリヒア・コリ(Escherichia coli)HB101株であることを特徴とする第6項記載の微生物細胞。

(9) ヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質を

コードするDNA領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有するDNA領域及びシグナルペプチドをコードするDNA領域を有するプラスミドによって形質転換された微生物を、ベリプラズムにヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質が生成、蓄積するまで培養を行ない、培養物からヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質を採取することを特徴とするヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質の製造方法。

(10) 该微生物がエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属することを特徴とする第9項記載の方法。

(11) 该微生物がエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HB101 株であることを特徴とする第9項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(1) 技術分野

本発明はヒト免疫グロブリンG (以下 "Ig G" と略すことがある) Fc領域蛋白質をコードするDNA断片を有する新規組換えプラスミド、該プラスミドにより形質転換された新規組換え微

子操作技術によって産出することができれば、医薬品製造のために極めて有利であることは論を待たない。

さて、ヒトIgGは2本のH鎖 (heavy chain) と2本のL鎖 (light chain) がジスルフィド結合で結ばれた形をとる。ヒトIgG分子にババインなどの蛋白質分解酵素を作用させると分子中央で切断され、抗原結合活性のある断片 (Fab領域蛋白質) と、抗原結合活性はなく条件により結晶化しやすい断片 (Fc領域蛋白質) とに分かれる。Fab領域蛋白質はL鎖全体とH鎖のアミノ末端側の半分を含み、1分子のIgGから2分子のFab領域蛋白質が生じる。一方、H鎖のカルボキシル末端側の半分であるFc領域蛋白質は、ヒンジ(h)、C₁、C₂、C₃の3つの部位より成り、ヒンジ部位において2本の鎖がジスルフィド結合によって結ばれている。そして、Fc領域蛋白質はエフェクター (effector) 機能を有している。

従来、r-グロブリン製剤は、無(低) r-グロブリン血症への補充、ウイルス感染症の予防と

生物細胞及び該微生物を用いたヒトIgG Fc領域蛋白質の分泌による製造方法に関する。

(2) 発明の背景

すべての脊椎動物の体液中に存在し、抗原と特異的に結合する能力を有する蛋白質が抗体であり、抗体蛋白質と構造的、機能的関連をもつ蛋白質は総称して免疫グロブリンといわれている。免疫グロブリン (以下 "Ig" と略すことがある) は、物理化学的あるいは免疫学的な性状から、IgG、IgA、IgM、IgE、IgDの5つのクラスに分類される。

なかでもIgGは細菌やウイルスに対する生体防御に重要な役割を持っており、従来より、ヒトIgGを多量に含むr-グロブリン百分をヒトの血液より分離し、一部変性することにより重症患者のための免疫製剤として用いられてきた。しかしながら、これは原料を人血に依存しており、その大量の安定した入手が困難であること、またそのために均質で安全なものを常時得にくいという難点があった。そこでヒト免疫グロブリンを遺伝

治原投与、等に適用してきた。近年、r-グロブリン製剤が特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 治療に有効であり (P.Labachら, Lancet, 1, 1228(1981))、特にそのFc領域が重要であることが示唆されている (朴ら, 臨床免疫, 15 (Suppl 1.7) 76(1983))。また、全身性エリテマトーデス (SLE) 等における腎糸球体沈着免疫複合体が、ヒトIgG Fc領域蛋白質の添加により融解したという報告もある (河住ら, 臨床免疫, 16, 240(1984))。以上のように、Fc領域蛋白質は、ITPやSLEのような自己免疫疾患の治療薬として用いることができる可能性があるが、作用機序などを含めて不明な点が多い。十分な量のFc領域蛋白質を供給できないことが、この理由の1つとなっている。

近年の遺伝子操作技術の発達により、種々の有用蛋白質の微生物等を用いた生産が可能になった。しかしながら、通常、有用蛋白質は主として菌体内の細胞質に蓄積されるものであり、所望の有用蛋白質を分泌する微生物は限られたものしか知ら

れていない。有用蛋白質を微生物菌体内の細胞質で過剰生産させた場合、フィードバック機構により生産が抑制されるような事が起こり得るが、分泌により生合成系から外へ移行させることにより、フィードバックの解除が可能になる。また、宿主微生物に対して toxic な有用蛋白質の生産においても、分泌生産が有用である。さらに、一般に分泌性蛋白質の種類はそれほど多くないため、有用蛋白質を分泌させればその精製工程の簡略化が期待でき、工業的にみてコストダウンがはかる。以上の理由により、所望の有用蛋白質を分泌生産するような微生物を任意に創製することができれば、その産業上の利用性は極めて大きい。

一般に分泌性の蛋白質は、アミノ末端に20~40残基程度のアミノ酸からなるシグナルペプチドといわれるものがついた状態で产生され、細胞膜を通過し分泌されるときにシグナルペプチダーゼという酵素によってシグナル領域が切断されて、シグナルペプチドを含まない蛋白質が分泌される。この機構は基本的に高等生物でも微生物でも同様

7)由來の染色体DNAより、プラスミドベクター pMB9 (R.L.Rodriguez ら、Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression, ICN - UCLA, symp.Mol.Cell.Biol. (ed.D.P.Nierlich ら)、V、471、Academic Press Inc.、New York(1976)) を用いて、ベニシリナーゼ遺伝子の大腸菌によるクローニングに成功した (T.Kudoら, J.Bacteriol., 156, 949(1983))。このベニシリナーゼ遺伝子には、プロモーター領域、シグナルペプチドをコードする領域、及び成熟ベニシリナーゼ蛋白質をコードする領域が含まれており、このプロモーター領域及びシグナルペプチド領域を利用することにより、有用蛋白質を大腸菌のペリプラズムへ分泌させることが可能と考えられる。

そこで、本発明者らは、この菌体外分泌に関する研究を更に進めた結果、ヒトIgG Fc領域蛋白質のペリプラズムへの分泌発現に成功し、本発明を完成するに至ったものである。

(3) 発明の目的

本発明の目的は、ヒトIgG Fc領域蛋白質

に考えられ、本末分離されない蛋白質にシグナルペプチドをつけてやることによって、細胞膜を通過させることも可能なわけである。

一方、遺伝子操作において最もよく用いられる微生物である大腸菌 (エシエリヒア・コリ (Escherichia coli)) は、その周囲を内膜・外膜という二つの膜で囲まれており、内膜と外膜との間にペリプラズムと呼ばれる空間が存在する。従って、シグナルペプチドを用いることにより内膜を通過した蛋白質は、外膜を通過できないためペリプラズムに蓄積することになるわけであるが、ペリプラズムの蛋白質はオスモティック・ショック法により容易に他の細胞蛋白質から分離することができる。従って產生された蛋白質をペリプラズムに蓄積させることができれば、これより容易に高純度の目的蛋白質を得ることができるので、その工業的価値は大きい。

近年、本発明者らの一部は、ベニシリナーゼを菌体外に分泌する能力を有する好アルカリ性バチルス (Bacillus) No 170株 (F E R M B P - 46

をコードするDNAを含むDNA断片、及びその断片が組み込まれた新規組換えプラスミドを提供することにある。

本発明の他の目的は、上記新規組換えプラスミドによって形質転換され、目的とするヒトIgG Fc領域蛋白質を、ペリプラズムに產生し得る新規組換え微生物細胞を提供することにある。本発明の更に他の目的は該微生物細胞を用いてヒトIgG Fc領域蛋白質をペリプラズムに分泌生産させる方法を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、以下の説明から一層明らかとなるであろう。

(4) 発明の構成

本発明者の研究によれば、前記本発明の目的は、ヒトIgG Fc領域蛋白質をコードするDNA領域、該蛋白質の発現調節を行なうプロモーター機能を有するDNA領域およびシグナルペプチドをコードするDNA領域を有する新規プラスミドを提供し、また該新規プラスミドによって形質転換された組換え微生物細胞を提供し、更に該組換

え微生物細胞を用いて目的とするヒト Ig G Fc 領域蛋白質を微生物のペリプラズムへ分泌する方法を提供することにより達成されることが分った。

以下本発明について更に詳細に説明する。

(ヒト免疫グロブリンG Fc 領域遺伝子のクローニング)

ヒト Ig G を産生する細胞、たとえばヒト骨髓腫細胞 AR H 77 株 (K.H.Burkら, J.Cancer Res., 38, 2508(1978)) を、適当な条件下、たとえば 37 ℃、炭酸ガス濃度 5 % で培養増殖させ、得られた細胞を遠心分離によって集める。この細胞を、たとえばラウリル硫酸ナトリウム (SDS) のような界面活性剤存在下で、たとえばプロテアーゼ K のような蛋白質分解酵素を用いて溶解させる。さらに、たとえばフェノールによる抽出によって除蛋白質を行ない、ヒト染色体 DNA を得る。

こうして得られた DNA を、たとえば Eco RI のような制限酵素で切断し、適当なファージ・ベクター、たとえばシャロン 4 A ベクター (F.R.

Blattnerら, Science, 196, 161(1977)) と連結した後、イン・ビトロ・パッケージング (A.Becker ら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72, 581(1975)) を行ない、ヒトの遺伝子ライブラリーを得る。Eco RI 以外の制限酵素を用いる場合や、クローニングサイトとして Eco RI をもたないような他のファージ・ベクターを使用する場合には、適当なリンクーDNA を用いれば遺伝子ライブラリーの作成が可能になる。

この遺伝子ライブラリーのファージを、たとえばエシェリヒア・コリ LE 392 株 (ATCC 33572) に感染、plaques を形成させ、たとえばブラーク・ハイブリダイゼーション法 (H.D.Beatsonら, Science, 196, 180(1977)) によって目的クローニングの選択を行なう。プローブとしては、たとえばニックトランスレーション法 (P.W.J.Bigby ら, J.Mol.Biol., 113, 237(1977)) により ³²P 標識を行なったヒト免疫グロブリン H 領域 (Fab 領域の中の一部であり、抗原結合活性を有する可変部とエフェクター機能を有する定常部との境界に

存在) 遺伝子や、あるいはヒト Ig G Fc 領域蛋白質のアミノ酸配列に対応すると考えられる塩基配列をもつオリゴスクレオチドを化学合成した後、これを ³²P 標識したもの用いることができる。

このブラーク・ハイブリダイゼーションによって陽性を示したクローニングの制限酵素切断点地図を作成し、ヒト染色体由来の DNA 断片を、たとえば pBR 322 (F.Bolivar ら, Gene, 2, 95(1977)) のようなプラスミド・ベクターにサブクローニングする。得られたサブクローニングの挿入部分の DNA 塩基配列を、例えばマキサム・ギルバート法 (A.M.Maxam ら, Methods Enzymol., 65, 499(1980)) あるいは M13 ファージを用いたジデオキシ・チーン・ターミネーション法 (J.Messing ら, Nucleic Acids Res., 9, 309(1981)) の方法により決定し、ヒト Ig G Fc 領域遺伝子の存在を確認する。第 1 図に、ヒト Ig G Fc 領域蛋白質のアミノ酸配列及びそれをコードする DNA 塩基配列の一例を示す。

こうして得られたヒト Ig G Fc 領域遺伝子は、ヒト染色体のものであるから、実際にアミノ酸をコードしないイントロン (intron) を含んでおり、このままでは微生物中で発現させることはできない。そこで、この Fc 領域遺伝子を適当な制限酵素で切断し、イントロンの部分を完全に除去する。この制限酵素切断の際に、実際にアミノ酸をコードするエクソン (exon) の部分も削り取られてしまうことがあるが、その場合には化学合成したオリゴスクレオチドのジョイントを用いて削られた部分を修復させると共に、残り合ったエクソン同志を連結させる。同時に合成オリゴスクレオチドを用いた同様な手法により、Fc 領域遺伝子の 3' 末端に読みとりフレームを一致させるように翻訳終止コドン (TGA, TAG, TAA) を 2 つ以上タンデムに連結し、発現効率の向上をはかることができる。ここで得られたイントロンのない Fc 領域遺伝子は、やはり合成オリゴスクレオチドを用いた手法を用い、その上流に読みとりフレームを一致させるように翻訳開始コ

ドンを付与することができる。さらにこのF c領域遺伝子は、適当なプロモーター、SD(シャイニ・ダルガーノ)配列の下流につなぐことにより、菌体内発現型遺伝子とすることができる。使用可能なプロモーターとして、トリプトファン・オペロン・プロモーター(Lac プロモーター)、ラクトース・オペロン・プロモーター(Lac プロモーター)、 Lac プロモーター、 P_L プロモーター、 Lac プロモーター等があげられるが、とりわけ Lac プロモーターや Lac プロモーターが好適である。F c領域遺伝子を効率良く発現させるためには、プロモーター、SD配列、翻訳開始コドン、翻訳終止コドンのすべてを連結したものが好ましく、プロモーター、SD配列、翻訳開始コドン、F c領域遺伝子及び翻訳終止コドンが、この順序で連結したものがとりわけ好ましい。

本発明の団体内発現型ヒト IgG Fc 領域遺伝子を、適当なプラスミド・ベクター、たとえば pBR322 に挿入することにより、発現型プラスミドが作成できる団体内発現型プラスミドとして、

の形質転換株をスクリーニングすることにより、好アルカリ性バチルス菌 170株ベニシリナーゼ遺伝子を有する組換えプラスミド、たとえば p E A P I を得る。

得られた組換えプラスミドのDNA塩基配列を、たとえば前記マキサム-ギルバート法あるいは前記M13ファージを用いたジデオキシ・チーン・ターミネーション法により決定し、ペニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域、シグナルペプチド領域及び成熟ペプチド領域の構造を明らかにする。第1図に、好アルカリ性バチルス菌 170株ペニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域とシグナルペプチド領域のDNA塩基配列を示す。また、シグナルペプチド領域については、対応するアミノ酸配列も合わせて示す。

このペニシリナーゼ遺伝子を有する組換えプラスミドを出発材料として、自然欠失を利用した方法、あるいはS1-スクレアーゼ、DNA-ポリメラーゼ等の修飾酵素や合成オリゴスクレオチドを用いる人為的方法により、ペニシリナーゼ遺伝

好みしくは、pFC203、pFC211、pFC361、pFC362が用いられる。

《好アルカリ性バチルス 170株ベニシリナーゼ
遺伝子のクローニング》

ペニシリナーゼ生産能を有する好アルカリ性バチルス菌 170株 (FERM BP-467) を適当な条件下、たとえば30℃で振とう培養し、得られた菌体を遠心分離によって集める。この菌体から、公知の方法、たとえばフェノール法によってDNAを抽出し、染色体DNAを得る。

こうして得られたDNAを、例えばEcoRIのような制限酵素で部分的に切断し、適当なプラスミドベクター、たとえばpMB9プラスミドのEcoRIサイトへの挿入を行ない、好アルカリ性バチルスNo.170株染色体DNAを組み込んだ組換えプラスミドを得る。この組換えプラスミドを、たとえばエシェリヒア・コリHB101株(ATCC 3694)に公知の方法、たとえばCaCl₂法(V. Norgardら、Gene, 3, 279(1978))を用いて導入、アンピシリン及びテトラサイクリンに対する

子の全域あるいは一部を含む、組換えプラスミドが得られる。このようなプラスミドとして、好玉しくは p E A P 3 が用いられる。

また、上述のベニシリナーゼ遺伝子を有する組換えプラスミドを、適当な制限酵素で切断し、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含むDNA断片を得る。このDNA断片を、必要なら適当な合成オリゴヌクレオチド・リンカーを介して、適当なプラスミドベクター、例えばpCM1 (T.J.CloseとR.Rodriguez, Gene, 20, 305(1982)) とpCM7 (T.J.CloseとR.Rodriguez, Gene, 20, 305(1982))とのハイブリッド・プラスミドpCM71にクローン化し、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するプラスミドが得られる。ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するプラスミドとして、好ましくはpPS1が用いられる。

（分離型プラスミドの作成）

前に得られたヒト IgG Fc 領域固体内発現

型プラスミド、たとえばpFC362を、適当な制限酵素で切断することにより、団体内発現のためのプロモーター領域を削減し、その部分に適当なプロモーター領域及びシグナルペプチド領域、例えば好アルカリ性バチルスNo.170株ベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域との連結用の合成オリゴスクレオチド・ジョイントを挿入した形のプラスミドを得る。このようなプラスミドとして、好みしくはpSEC-FCが用いられる。

次にこのプラスミドに、適当なプロモーター領域及びシグナルペプチド領域を有するプラスミドを適当な制限酵素で切断することにより得られる適当なプロモーター領域を有するDNA断片及びシグナルペプチド領域を有するDNA断片を挿入し、適当なプロモーター領域及びシグナルペプチド領域下流にヒトIgGFc領域遺伝子が連結した形のプラスミドが得られる。このようなプロモーター領域・シグナルペプチド領域を有する遺伝子としては、大腸菌IgT-ラクタマーゼ遺伝子、大腸菌アルカリ性ホスファターゼ遺伝子、大腸菌

DNA領域、すなわち該DNA領域に対してスクレオチドの置換、スクレオチドの欠失、スクレオチドの挿入及びスクレオチド配列の逆位その他の突然変異によって関連づけられているDNA領域でもよいことはいうまでもない。

(ヒト免疫グロブリンG-Fc領域蛋白質の生産)

かくして得られた、ヒトIgGFc領域遺伝子団体内発現型プラスミド及びペリプラズム分泌発現型プラスミドを常法により適当な宿主に導入して組換え微生物を得、これを培養することにより、ヒトIgGFc領域蛋白質を生産させることができる。このような宿主としてはエシェリヒア(Escherichia)属に属する微生物を有利に使用することができる。宿主としては、前記のエシェリヒア・コリHB101株、同C600株、同DP-supF株、同z1776株、同LE392株等、通常この種の技術分野で用いられる微生物が有利に用いられる。なかでも、エシェリヒア・コリHB101株及び同C600株がとりわけ好みしい。

このようにして得られた組換え微生物を、それ

リボプロテイン遺伝子、枯草菌ベニシリナーゼ遺伝子、枯草菌プロテアーゼ遺伝子、酵母α因子遺伝子、好アルカリ性バチルスNo.170株ベニシリナーゼ遺伝子、好アルカリ性エアロモナス(Aeromonas)No.212株キシラナーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルスNo.N-4株セルラーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルスNo.1139株セルラーゼ遺伝子等があげられるが、好みしくは好アルカリ性バチルスNo.170株ベニシリナーゼ遺伝子が用いられる。適当なプロモーター領域、適当なシグナルペプチド領域及びヒトIgGFc領域遺伝子が、この順序に連結された形のプラスミドが最も好みしく、このプラスミドを用いることにより、ヒトIgGFc領域蛋白質のペリプラズムまでの分泌が可能になる。このようなペリプラズム分泌発現型プラスミドとして、好みしくはpPS-FCが用いられる。

なお、本発明において適当なプロモーター領域、シグナルペプチド領域、ヒトIgGFc領域遺伝子は、これらと生物学的機能において同等なD

自体は公知の方法で培養する。培地としては、ヒトIgGFc領域蛋白質の生産に適した培地であって、かつ宿主微生物の生育に適した培地を用い得るが、たとえばM9培地(T.Maniatisら編、Molecular Cloning P440(Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982))、LB培地(T.Maniatisら編、Molecular Cloning, P440(Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982))、BPPB培地(Difco製)、Nutrient寒天培地等を基本培地として調製したものを用いればよい。その他、必要に応じて、炭素源窒素源の他にアミノ酸、ビタミン等の栄養素を添加してもよいし、発現型プラスミドの宿主内安定化のために適当量の抗生素等を添加してもよい。

培養は、pH、温度、酸素供給量を目的の組換え微生物に適した条件で行なう。団体内発現型プラスミドを有する組換え微生物の培養においては、プロモーターを効率良く機能させるも目的で、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド等の薬剤を加えることもできる。ペリプラズム分泌発現型

なお、アミノ酸などに關して光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければし体を示すものとする。

Cys : システイン
Met : メチオニン
Glu : グルタミン酸
Asp : アスパラギン酸
Lys : リジン
Ala : アルギニン
His : ヒスチジン
Phe : フェニールアラニン
Tyr : チロシン
Trp : ドリブトファン
Pro : プロリン
Asn : アスパラギン
Gln : グルタミン
Gly : グリシン
Ala : アラニン
Val : バリン
Leu : ロイシン

プラスミドを有する組換え微生物の培養においては、該微生物が生育してその固体量が最大に達したとき、即ち対数増殖後期からペリプラズムにF_c領域蛋白質が生成、蓄積するまでの時間中、同一培地で培養をそのまま継続するのがよい。なお、pH条件は特に影響されないが、pH 5~8の範囲、特にpH 7が適当である。

培養後、たとえばオスモティック・ショック法(C. Katoら、E. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 339(1983))を用いて、培養物を固体内画分、ペリプラズム画分とに分画する。画分におけるヒトIgG F_c領域蛋白質の有無は、たとえば市販のウサギ抗ヒトIgG-F_c成分抗血清及び群衆疾患抗ウサギIgG抗体を用いたエンザイム・イムノアッセイ(EIA)により確認できる。

本発明において、アミノ酸、ペプチド、核酸、その他に関し略号で表示する場合、それらはI.U. PAC-IUB生化学命名委員会(CBN)による路号あるいは当該分野における慣用路号に基づいて表示され、例えば下記の路号が使用される。

Ile : イソロイシン
Ser : セリン
Thr : スレオニン
DNA : デオキシリボ核酸
A : アデニン
T : チミン
C : グアニン
G : シトシン
EDTA : エチレンジアミン四酢酸
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

以下実施例を擇げて本発明について詳細に説明するが、本発明はこれらこれにより限定されるものではない。

実施例1 (ヒト染色体DNAの単離)
ヒト骨髄腫細胞ARH77株 3×10^8 個をガラス棒でつぶし、2% SDS存在下、プロテアーゼK(シグマ)で処理した後、TEバッファー(10mM Tris-HCl(pH 8.0)、1 mM EDTA)で飽和したフェノールを加えた。遠心分離(10,000 rpm × 15時間、20°C)を行ない、15Kbp~23Kbpに相当するDNA断片4.3 μgを得た。次に、DNA断片0.8 μgとシャロン+ Aベクターの右の連結を行い、シャロン+ Aベクターの右のムと左のアームの間にヒト由来のDNAが挿入されたハイブリッドDNAを得た。連結にはDNALigaーゼ(ベセスダ・リサーチ・ラボ)

抽出)、水相をTESバッファー(20mM Tris-HCl(pH 7.5)、100 mM NaCl、5 mM EDTA)に対して透析した。リボヌクレアーゼA(シグマ)処理をし、再度フェノール抽出を行なった後、TEバッファーに対して透析し、ヒト染色体DNA約1.2μgを取得した。(X. Blinら、Nucleic Acids Res., 3, 2303(1976)参照)。

実施例2 (ヒト遺伝子ライブラリーの作成)
実施例1で得られたヒト染色体DNA 150 μgを後述する実施例1に示した方法に準じて制限酵素 Eco RI(宝酒造)で部分分解した後、酢酸密度勾配遠心(底層10~40% (wt/vol)、28000 rpm × 15時間、20°C)を行ない、15Kbp~23Kbpに相当するDNA断片4.3 μgを得た。次に、DNA断片0.8 μgとシャロン+ Aベクターの右の連結を行い、シャロン+ Aベクターの右のムと左のアームの間にヒト由来のDNAが挿入されたハイブリッドDNAを得た。連結にはDNALigaーゼ(ベセスダ・リサーチ・ラボ)

リーズ)を用い、連結反応は56mM Tris-HCl (pH 7.6)-6.6 mM MgCl₂-10 mMジチオスレイトール-1 mM ATP水溶液中で、11℃、12時間行なった。得られたハイブリッドDNAについて、イン・ビトロ・パッケージングを行ない、ヒト遺伝子ライブラリー(1.8×10^6 PFU/ μ g、ヒト染色体DNAの99%以上を含む)とした。

実施例3 (ヒト免疫グロブリンG遺伝子のスクリーニング)

前記実施例2で得られたヒト由来のDNAを含むシャロン4Aファージの集合(遺伝子ライブラリー)をエシェリヒア・コリLE392株に感染させ、plaquesを形成させた。ヒト抗体遺伝子を含むクローンは、plaques・ハイブリダイゼーション法により、(³²P)-標識ヒト免疫グロブリンG H鎖J遺伝子で選択した。ヒトIgG遺伝子を含むシャロン4AファージからのDNAの調製は、Thomasらの方法(M.Thomasら, J.Mol.Biol., 91, 315(1974)参照)により行なった。

サーチ・ラボラトリーズ製、Rsa I, Sau 3 A I, Taq Iはニッポン・ジーン製、それ以外は宝酒造製を用いた。) 2~4ユニットを添加して、37℃、1時間以上切断を行なった。制限酵素Bst N I及びTaq Iによる切断は、60℃で1時間以上切断を行なった。なお、二種類の制限酵素による切断を行なう場合には、まず低塩濃度で作用する制限酵素で処理し、次に所定濃度まで塩濃度を上げてから、より高塩濃度で作用する制限酵素で処理した。

制限酵素による切断後、4 μlの0.25%プロモフェノールブルー-50%グリセロール水溶液を加え、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%~2.5%)を行なった。アガロースはシグマ社のタイプII電気泳動用を使用した。電気泳動バッファーとして、40mM Tris-CH₃COOH (pH 8.0)-1 mM EDTA水溶液を用いた。厚さ2mmの垂直ゲルにて、6~9V/cmの電圧で1.5~3時間電気泳動を行なった。この電気泳動の際、DNA断片の分子量マーカーとして、メフ

実施例4 (制限酵素切断点地図の作成)

実施例3で得られたヒトIgG遺伝子を含むシャロン4A DNA 1 μgを制限酵素切断用バッファー(Eco RI, Hpa I, Hin d III, T aq I, Xba I, Xho I 切断では50mM Tris-HCl (pH 7.4)-100 mM NaCl-10 mM MgSO₄水溶液を、Acc II, Bam HI, Cla I, Hind III, Pst I, Rsa I, Sau 3 A I 切断では10mM Tris-HCl (pH 7.5)-60 mM NaCl-7 mM MgCl₂水溶液を、Bam II, Bst N I, Nae I, Sst I 切断では10mM Tris-HCl (pH 7.4)-10 mM MgSO₄-1 mM ジチオスレイトール水溶液を、そしてSma I 切断では10mM Tris-HCl (pH 8.0)-20 mM KCl-7 mM MgCl₂-7 mM 2-メルカプトエタノール水溶液を、それぞれ用いた。) 20 μlに溶解させ、制限酵素(Bst N I, Cla I, Nae Iはニュー・イングランド・バイオラブズ製、Sst Iはベセスダ・リ

アージのDNAを制限酵素Hind IIIで切断したもの(ベーリンガー・マンハイム)を用いた。電気泳動終了後、アガロースゲル中のDNAを2 μg/mℓエチジウムプロマイド水溶液で染色し、このゲルに対して長波長紫外線を照射して、切断パターンの観察を行なった。各種制限酵素単独による切断、及び二種の制限酵素の組合せによる切断、これらの切断パターンを解析することにより、第2図(A)に示すような各制限酵素切断点の相対位置関係を決定した。第2図(A)はIgG遺伝子を含むヒト染色体DNAの制限酵素切断点地図を示す。

実施例5 (ヒト免疫グロブリンG遺伝子断片のサブクローニング)

ヒトIgG遺伝子を含むシャロン4A DNA 3 μgを実施例4の方法に準じて制限酵素Hind IIIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)を行なった。ヒトIgG Fc領域遺伝子を含む約8.2 KbpのDNAの部分に相当するバンドを切出し、そのアガロースゲル断片を3倍

量(vol/wt)の8M NaClO₄水溶液に溶解させた。Chenらのグラスフィルター法(C.W.Chenら、Anal.Biochem., 101, 339(1980))により、約8.2KbpのDNA断片をアガロースゲルにより回収した。一方、大腸菌用プラスミドpBR322 1μgを実施例4に準じて制限酵素HindⅢで切断したものに対して、アルカリ性ホスファターゼ(E.coli C75)（宝酒造）を0.5ユニット加えて、37℃で1時間反応させた。反応終了後、反応液中のアルカリ性ホスファターゼを失活・除去するため、フェノール抽出を3回繰返した。このようにして得られたpBR322のHindⅢ-アルカリ性ホスファターゼ処理液を、ゲルより回収した約8.2Kbp HindⅢ断片水溶液と混ぜ、エタノール沈殿の後、速結反応用バッファー（実施例2を参照）50μlに溶解させる。2ユニットのT4-DNAリガーゼを加え、11℃、12時間反応させて、速結反応を行なった。

エシェリヒア・コリC600株(ATCC 33525)の形質転換は、通常のCaCl₂法(M.V.No

/mlを含むし培地プレート)に100μl/プレートの割合で接種する。プレートを37℃で1晩培養して、形質転換株を生育させる。得られたアンビシリントリニーのコロニーより、公知の方法を用いてDNAを調製し、アガロースゲル電気泳動により、目的のサブクローンpTJ1B(約12.6Kbp)を確認した。

前記実施例4の方法により作成した、このサブクローンの制限酵素切点地図を第2図(B)に示した。この第2図(B)においてPstI-(3)からHindⅢ-(3)の間に、PstIサイトが3~4個存在することは確認したが、その位置についての確認は行なっていない。

さらに、前記プラスミドpTJ1BのPstI-(2)→PstI-(3)のDNA断片(約1.7Kbp)を、pTJ1Bの場合とほぼ同様の手法により、プラスミドpBR322のPstIサイトに挿入し、プラスミドpTJ5(約6.1Kbp)を作成した。目的のクローンは、テトラサイクリン耐性の形質転換株の中から選択した。得られたサブクロ

rgardらの方法、前記)の改良法で行なった。すなわち、5mlのし培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、pH7.2)に大腸菌C600株の18時間培養基を接種し、菌体を含む培養液の600μlにおける濃度(O.D.)0.3まで生育させる。菌体を冷たいマグネシウム・バッファー(0.1M NaCl、5mM MgCl₂、5mM Tris-HCl(pH7.6、0℃))中で2回洗い、2mlの冷やしたカルシウム・バッファー(100mM CaCl₂、250mM KCl、5mM MgCl₂、5mM Tris-HCl(pH7.6、0℃))中に再懸濁させ、0℃で25分間放置する。次に菌体をこの容量の1/10にカルシウム・バッファーの中で濃縮し、速結後のDNA水溶液と2:1(vol:vol)混合する。この混合物を60分間、0℃で保った後、1mlのLBG培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、0.08%グルコース、pH7.2)を添加し、37℃で1時間培養する。培養液を、選択培地(アンビシリントリニー30μg

の制限酵素切点地図を、第2図(C)に示した。

実施例6(ヒト免疫グロブリンG Fc領域遺伝子DNA塩基配列の決定)

ヒトIgG Fc領域遺伝子のDNA塩基配列は、マキサム・ギルバート法により決定した。

たとえば、前記実施例5において作成されたサブクローンpTJ5 DNA約50μgを実施例4の方法に準じてSmaIで切断する。得られたDNA断片をアルカリ性ホスファターゼで脱ホスホリル化し、ポリスクレオチドキナーゼ(P-レバノン酸カルバム)5ユニットを用いて(³²P)ATPで標識した。ポリスクレオチドキナーゼ反応は50mM Tris-HCl(pH7.5)-10mM MgCl₂-5mMジチオスレイト-アル水溶液中で行ない(³²P)ATPはアマーリヤム製を100μCi分用いた。³²P標識DNA断片をPstIで切断した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)により目的のDNA断片を分離し、後述の実施例7の方法に従

ってゲルからの抽出を行なった。得られた³²P標識-Sma I—Pst I断片について、各塩基特異的な部分分解反応を行ない、7M尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度8%～23%）で分離した。2～7日間、-80°Cでオートラジオグラフィーを行なった後、分解パターンの解析を行ない、Fc領域遺伝子の塩基配列決定のための資料とした。

一方、pTJ5をPst Iで切断した場合には、3'末端標識キット（アマーシャム）を用いて、(α -³²P)-ddATPによる標識を行なった。この³²P-標識DNA断片をSma Iで切断した後、目的のDNA断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度5%）による分離・回収を行なった。得られた³²P標識-Pst I—Sma I断片についても、上記手順に従って解析を行ない、Fc領域遺伝子の塩基配列決定のための資料とした。

実施例7 (Fc領域C_x 3部位遺伝子のクローニング)

こうして得られたC_x 3部位遺伝子を含む約310bpのRsa I—Nae IのDNA断片を、実施例5の方法に準じてプラスミドpBR322のBam Iサイトに挿入し、C_x 3部位遺伝子の読みとり方向がプラスミドpBR322中のテトラサイクリン耐性遺伝子の読みとり方向と一致する方向（第3図において時計まわりの方向）に挿入されたプラスミドpFC70（約4.7Kbp）を作成した。pFC70作成の方法を第3図に示した。

実施例8 (Fc領域C_x 2部位遺伝子とC_x 3部位遺伝子の連結)

実施例7で得られた、Fc領域遺伝子を含む約1.7KbpのDNA断片を、実施例4の方法に準じて制限酵素Sau 3A IおよびTaq Iで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度5%）の後、C_x 2部位遺伝子を含む約240bpのDNA断片約0.5μgを、実施例7の方法に準じて、ポリアクリルアミドゲルから回収した。

C_x 2部位とC_x 3部位の連結部分に相当する、第4図記載の塩基配列を有する2本鎖オリゴスク

レオチドを、上の鎖と下の鎖とに分けて化学合成した。オリゴスクレオチドの合成は全自动DNA合成機（アプライド・バイオシステムズ、モデル380 A）を用いて、ホスフォアミグロ法により行なった。合成オリゴスクレオチドの精製は、アプライド・バイオシステムズ社のマニュアルに準じて行なった。すなわち、合成オリゴスクレオチドを含むアンモニア水溶液を55°Cで一晩保つことにより、DNA塩基の保護基をはずし、セファデックスG-50ファイン・ゲル（ファルマシア）を用いたゲル通過によって、高分子量の合成オリゴスクレオチド画分を分取する。ついで、7M尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度20%）の後、紫外線シードウイング法により泳動パターンの観察を行ない、目的とする大きさのバンド部分を切出して、実施例7の方法に準じて合成オリゴスクレオチドをポリアクリルアミドゲルより回収した。最後に合成オリゴスクレオチドを含む溶液をゲル通過カラム（セファデックスG-50）にかけることにより、合成オリゴスクレオ

チドの精製品を得た。なお、必要に応じて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を繰り返し合成オリゴスクレオチドの純度の向上をはかった。このようにして得られた合成オリゴスクレオチド精製物 0.1 ~ 1.0 μ g を、実施例 6 の方法に準じて、1 mM ATP 存在下でポリスクレオチドキナーゼ反応を行ない、5' 末端側をリン酸化する。5' 末端をリン酸化した、上の鎖と下の鎖に相当する 2 本の合成オリゴスクレオチドを混合し、その水溶液温度を 70°C から室温まで徐々に冷却することにより、アニーリングを行なった。以上のようにして、C_n 2 部位と C_n 3 部位との連結部分に相当する T_{aq}I — S_aI の DNA 断片 (約 68 bp) を取得した。

一方、前記実施例 7 で作成したプラスミド pF C70 DNA 約 5 μ g を、実施例 4 記載の制限酵素 S_mA I 切断用バッファーに溶解し、2 ~ 5 ユニットの S_mA I を加えて 20°C で 15 ~ 45 分反応させて部分分解を行なう。フェノール抽出により S_mA I を失活させた後、実施例 4 の方法に準じて、

実施例 4 の方法に準じて制限酵素 S_sI II 及び P_st I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル温度 0.8 %) の後、C_n 2 部位遺伝子の後半部分、C_n 3 部位遺伝子全域及びベクターの一部を含む、第 5 図記載の S_sI II — P_st I の DNA 断片 (約 2.7 Kbp) を、実施例 5 の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

次に、実施例 7 で得られた F_c 領域遺伝子を含む約 1.7 Kbp の DNA 断片を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 B_st N I 及び S_sI II で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ゲル温度 5 %) の後、C_n 2 部位遺伝子の前半部分を含む約 171 bp の B_st N I — S_sI II の DNA 断片を、実施例 7 の方法に準じて、ポリアクリルアミドゲルから回収した。

さらに、プロモーターと F_c 領域遺伝子との連結部分に相当する、第 5 図記載の塩基配列を有する 2 本鎖オリゴスクレオチド (約 39 bp) を、実施例 8 の方法に準じて作成した。この C₂a I — B_st N I — (5) の DNA 断片中には、l_rp プロ

モーターによる切断を行なう。アガロースゲル電気泳動 (ゲル温度 0.8 %) の後、C_n 3 部位遺伝子とベクターの大部分を含む第 4 図記載の B_am H I — S_mA I — (II) の DNA 断片 (約 3.6 Kbp) を、実施例 5 の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、C_n 2 部位遺伝子を含む S_au 3 A I — T_aq I の DNA 断片、C_n 2 部位と C_n 3 部位の連結部分に相当する T_aq I — S_aI の DNA 断片、そして C_n 3 部位とベクター部分を含む B_am H I (S_au 3 A I) — S_mA I — (II) の DNA 断片を混合し、実施例 5 の方法に準じて、C_n 2 部位遺伝子と C_n 3 部位遺伝子がイントロンを介さずに連結された遺伝子を含むプラスミド pF C77 (約 3.9 Kbp) を作成した。第 4 図に pF C77 の作成方法を示した。

実施例 9 (F_c 領域遺伝子と l_rp プロモーターとの連結)

実施例 8 で得られたプラスミド pF C77 を、実

モーターとの連結のための制限酵素 C₂a I サイト、ATG という塩基配列で表わされる翻訳開始コドン、h 部位遺伝子及び C_n 2 部位遺伝子の一部が連続して含まれており、この DNA 断片を用いることにより、イントロンのない F_c 領域 (h — C_n 2 — C_n 3 部位) 遺伝子をトリプトファン・オペロン・SD 配列下流に適当な距離をへだてて連結することが可能になった。

一方、l_rp プロモーターを含むプラスミド pYS31N (約 4.7 Kbp) を、実施例 4 の方法に準じて制限酵素 P_st I 及び C₂a I で切断し、アガロースゲル電気泳動 (ゲル温度 0.8 %) の後、l_rp プロモーター及びベクターの一部を含む、第 5 図記載の P_st I — C₂a I の DNA 断片 (約 1.1 Kbp) を、実施例 5 の方法によりアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、C_n 2 部位遺伝子後半と C_n 3 部位遺伝子とベクターの一部を含む S_sI II — P_st I の DNA 断片、C_n 2 部位前半部分を含む B_st N I — (5) — S_sI II の D

DNA断片、プロモーターとF c領域遺伝子との連結部分に相当するC₂a I —— Bst N I - (5)のDNA断片、そしてi_cpプロモーターとベクターの一部を含むPst I —— C₂a IのDNA断片を混合し、実施例5の方法に準じて、F c領域(h-C_w2-C_w3部位)遺伝子発現型プラスミドpFC203(約4.0 Kbp)を作成した。第5図にpFC203の作成方法を示した。

実施例10(F c領域遺伝子翻訳終止コドンのタンデム化)

実施例9で得られたF c領域遺伝子発現型プラスミドpFC203を、実施例8に記載の方法に準じて、制限酵素Sma Iで部分分解した後、制限酵素Pst Iによる完全分解を行なう。アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、F c領域遺伝子の大部分とベクターの一部を含む第6図記載のSma I - (2) —— Pst IのDNA断片(約1.8 Kbp)を、実施例5の方法に準じてアガロースゲルより回収した。

また、C_w3部位遺伝子後部と翻訳終止コドン

に相当する、第6図記載の塩基配列を有する2本鎖オリゴヌクレオチド(約17bp)を、実施例8の方法に準じて作成した。このSma I - (2) —— Bam H IのDNA断片中には、C_w3部位遺伝子の一部、TAATAGという塩基配列で変わられるタンデム化翻訳終止コドン及びベクターとの連結のための制限酵素Bam H Iサイトが含まれており、このDNA断片を用いることによりF c領域遺伝子の翻訳終止コドンのタンデム化が可能になった。

一方、プラスミドpBR322を、実施例4の方法に準じて制限酵素Pst I及びBam H Iで切断、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、ベクターの大部分を含む、第6図記載のBam H I —— Pst IのDNA断片(約3.2 Kbp)を、実施例5の方法によりアガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、F c領域遺伝子の大部分とベクターの一部を含むSma I - (2) —— Pst IのDNA断片、C_w3部位遺伝子後部と

タンデム化翻訳終止コドンを含むSma I - (2) —— Bam H IのDNA断片、そして、ベクターの大部分を含むBam H I —— Pst IのDNA断片を混合し、実施例5の方法に準じて、タンデム化翻訳終止コドンを有するF c領域遺伝子発現型プラスミドpFC211(約5.0 Kbp)を作成した。第6図にpFC211の作成方法を示した。

実施例11(F c領域遺伝子とi_ccプロモーターとの連結)

実施例9で得られたF c領域遺伝子発現型プラスミドpFC203を、実施例4の方法に準じて制限酵素C₂a Iで切断し、ポリメラーゼ用バッファ(50mM Tris-HCl(pH7.2), 10mM MgSO₄, 0.1 mM ジチオスレイトール, 50μg/ml ウシ血清アルブミン)40μlに溶解し、0.25mMのdGTP及び0.25mMのdCTP存在下で、2ユニットのDNAポリメラーゼI・ラージ・フラグメント(ベセスタ・リサーチ・ラボラトリーズ)を加える。37℃で30分間反応させて、末端の平滑化をはかる。次に、このDNA

断片を、実施例4の方法に準じて制限酵素Pst Iで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、F c領域遺伝子全域とベクターの大部分を含む、第7図記載の約2.8 KbpのDNA断片を、アガロースゲルより回収した。

次に、i_ccプロモーターを含むプラスミドpDR540(約4.0 Kbp, ファルマシア)DNAを、実施例4の方法に準じて制限酵素Bam H Iで切断し、ついで上記の方法に準じて、dGTP, dATP, dTTP, dCTP存在下、DNAポリメラーゼI・ラージ・フラグメント処理により、末端の平滑化を行なう。次にこのDNA断片を、実施例4の方法に準じて制限酵素Pst Iで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、i_ccプロモーターとベクターの一部を含む、第7図記載の約1.1 KbpのDNA断片を、アガロースゲルより回収した。

以上のようにして得られた、F c領域遺伝子全域とベクターの大部分を含む約2.8 KbpのDNA断片と、i_ccプロモーターとベクターの一部を

含む約1.1 KbpのDNA断片とを混合し、実施例5の方法に準じて、lacプロモーターの下流にF c領域遺伝子が連結した形の発現型プラスミドpFC361(約3.9 Kbp)を作成した。第7図にpFC361の作成方法を示した。

上記により得られたF c領域遺伝子発現型プラスミドpFC361 DNAを、実施例4の方法に準じて制限酵素SstII及びPstIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、ベクターの一部、lacプロモーター及びF c領域遺伝子前半部分を含む、第7図記載のSstII—PstIのDNA断片(約1.3 Kbp)を、実施例5の方法によりアガロースゲルより回収した。

また、実施例10により得られたタンデム化翻訳終止コドンを有するF c領域遺伝子発現型プラスミドpFC211 DNAを、実施例4の方法に準じて制限酵素SstII及びPstIで切断した後、上記と同じ手法により、F c領域遺伝子後半部分、タンデム化翻訳終止コドン及びベクターの大部分を含む、第7図記載のPstI—SstIIのD

たもの)中、30℃で15時間振盪培養を行ない、対数増殖後期の菌体を集菌後、フェノール法によるDNA抽出法によって染色体DNAを抽出、精製し、染色体DNA 5 mgを得た。

実施例13(好アルカリ性バチルスNo170株染色体DNA断片のベクターへの挿入)

実施例12で得られた染色体DNA 10 μgをとり、実施例4の方法に準じて、制限酵素EcoRIを加え、37℃で反応させて部分的に切断した。一方、ベクターとして用いるテトラサイクリン抵抗性(Tetr)のpMB9プラスミドDNA(ベゼセスグ・リサーチ・ラボラトリーズ)を制限酵素EcoRIで完全に切断して65℃、5分の熱処理後、前者と混合して、実施例2の方法に従ってT4-DNAリガーゼによって10℃、24時間DNA鎖の連結反応を行ない、65℃、5分の熱処理後、反応液に2倍容のエタノールを加えて染色体DNAを組み込んだプラスミドDNAを沈殿、採取した。

実施例14(好アルカリ性バチルスNo170株ベニシ

NA断片(約3.6 Kbp)を得た。

かくして得られた、ベクターの一部、lacプロモーター及びF c領域遺伝子前半部分を含むSstII—PstIのDNA断片と、F c領域遺伝子後半部分、タンデム化翻訳終止コドン及びベクターの大部分を含むPstI—SstIIのDNA断片とを混合し、実施例5の方法に準じて、lacプロモーターの下流にF c領域遺伝子が連結され、なおかつタンデム化翻訳終止コドンを有する形の発現型プラスミドpFC362(約4.9 Kbp)を作成した。第7図にpFC362の作成方法を示した。

実施例12(好アルカリ性バチルスNo170株染色体DNAの調製)

ベニシリナーゼを菌体外に生成、蓄積する能力を有する好アルカリ性のバチルスNo170株(FERM BP-467)を培地((g/z):グリセロール 2.0、酵母エキス 5.0、ポリベブトン 5.0、K₂HPO₄ 1.0、MgSO₄·7H₂O 0.2をNaHCO₃ 10でpH 9.0に調整し

リナーゼ遺伝子のクローニング

実施例13で得られた好アルカリ性バチルスNo170株染色体DNAを有するプラスミドを、通常のC₃C₂法(M.V.Norgardらの方針、前記)により、エシェリヒア・コリHB101株に導入した。これらの形質転換株の中からアンビシリシン及びテトラサイクリンに耐性の株をスクリーニングし、好アルカリ性バチルスNo170株ベニシリナーゼ遺伝子を有するクローニングを選択した。この菌体を培養した後第10図のように処理することにより、ベニシリナーゼ遺伝子を含む4.5 Kbpの挿入を有する組換えプラスミドpEAP1が得られた。さらに、実施例4の方法に準じて制限酵素切断点地図を作成した。第9図にpEAP1の制限酵素切断点地図を示す。

実施例15(好アルカリ性バチルスNo170株染色体DNAを有するプラスミドのDNA塩基配列の決定)

好アルカリ性バチルスNo170株の染色体DNAを含むプラスミドのDNA塩基配列の決定は、M

13シーケンシング・キット(アマーチャム)を用い、M13ファージによるジデオキシ・チーン・クーミネーション法により行なった。第1図に好アルカリ性バチルスNo.170株ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナル領域のDNA塩基配列を示した。

実施例16 (好アルカリ性バチルスNo.170株染色体DNAを有する各種プラスミド誘導体の作成)

前記実施例14で得られたエシェリヒア・コリHB101(pEAP1)株を継代していく中で、ベニシリナーゼ活性の増強(pEAP1の約3倍)された変異株(アンビシリリン耐性(A_{p'}))、テトラサイクリン感受性(Tet^r))を得た。この変異株から第10図の方法によりプラスミドを調製したところ、ベニシリナーゼの構造遺伝子の上流約4Kbpが脱落したプラスミドpEAP3(約5.8Kbp)が得られた。第9図にpEAP3の制限酵素切点地図を示す。

実施例17 (好アルカリ性バチルスNo.170株ベニシ

連結し、65℃、5分間の熱処理後、反応液に2倍容のエタノールを加えてプラスミドDNAを沈殿・採取した。得られたプラスミドDNAを実施例14と同様にエシェリヒア・コリHB101株に導入形質転換し、アンビシリリン耐性形質転換株から第8図の方法によりプラスミドを分離・精製し、CAT遺伝子誘導体を含む新規プラスミドpCM71(約3.6Kbp)を得た。第10図にpCM71の作成方法を示す。

前記実施例16で得られたプラスミドpEAP3を実施例4の方法に準じて制限酵素RsaIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)の後、上記の方法に準じてベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナル領域を含むRsaI—RsaIのDNA断片(約200bp)を回収する。このRsaI—RsaIのDNA断片を末端をリン酸化したHindIIIリシンカー(宝酒造)と混合、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて連結させ、上記の方法に準じてアンビシリリン耐性、クロラムフェニコール耐性の形質転換株よりプラスミドpPS1(約3.7Kbp)を分離・精製した。このプラスミドpPS1においては、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域が、CAT遺伝子の上流に同じ読み取り方向で挿入された構造を有している。第11図にpPS1の作成方法を示した。

リナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナル領域を有するプラスミドの作成)クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子誘導体を含むプラスミドpCM1(約4.1Kbp、ファルマシア)を実施例4の方法に準じて制限酵素EcoRI及びSalIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、エレクトロエリューション法(P.J. Greeneら、"Methods in Molecular Biology" vol.1, Marcel Dekker, 1974, p.87)を用いて、約0.5KbpのCAT遺伝子後半部分を含むEcoRI—SalIのDNA断片を回収する。さらに、CAT遺伝子誘導体を含むプラスミドpCM7(約4.1Kbp、ファルマシア)を上記と同じにして、制限酵素EcoRI及びSalIで切断し、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)の後、CAT遺伝子前半部分とベクターの大部分から成る約3.1KbpのEcoRI—SalIのDNA断片を回収する。これらのDNA断片を混合し、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼで

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)の後、上記の方法に準じて末端がHindIIIサイトに変換されたベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含むDNA断片(約210bp)を回収する。一方、プラスミドpCM71を実施例4の方法に準じて制限酵素HindIIIで切断し、上記のベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域を含むHindIII—HindIIIのDNA断片と混合し、実施例2の方法に準じてT4-DNAリガーゼを用いて連結させ、上記の方法に準じてアンビシリリン耐性、クロラムフェニコール耐性の形質転換株よりプラスミドpPS1(約3.7Kbp)を分離・精製した。このプラスミドpPS1においては、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域及びシグナルペプチド領域が、CAT遺伝子の上流に同じ読み取り方向で挿入された構造を有している。第11図にpPS1の作成方法を示した。

実施例18 (Fc領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミドの作成)

実施例11で作成したF_c領域遺伝子団体内発現型プラスミドpFC362を、実施例4の方法に準じて制限酵素SstⅡ及びEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動（ゲル濃度0.8%）の後、lacプロモーター領域・h部位遺伝子・C_n2部位遺伝子の前半部分を含む約0.4KbpのEcoRI—SstⅡのDNA断片と、ベクターの大部分・C_n2部位遺伝子後半部分・C_n3部位遺伝子を含む約4.5KbpのEcoRI—SstⅡのDNA断片とを、実施例5の方法に準じてゲルより回収する。このうちのlacプロモーター領域・h部位遺伝子・C_n2部位遺伝子前半部位を有するEcoRI—SstⅡのDNA断片を、実施例4の方法により制限酵素BstNIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度5%）の後、C_n2部位遺伝子の一部を含む約171bpのBstNI—SstⅡのDNA断片を、実施例7の方法に準じてゲルより回収する。さらに、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域とF_c領域遺伝子との連結部

分に相当する、第12図記載の塩基配列を有する2本鎖オリゴスクレオチド（約51bp）を、実施例8の方法に準じて作成した。このEcoRI—BstNIのDNA断片中には、後のサブクローニングに必要な制限酵素SalⅠサイト、ベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域遺伝子との連結のための制限酵素HindⅢサイト、アミノ酸セリンをコードするTCAのコドン、ト部位遺伝子及びC_n2部位遺伝子の一部が含まれている。このDNA断片を用いることにより、大腸菌内で正しくシグナルペプチドが切断され、F_c領域蛋白質のアミノ末端にアミノ酸セリンが1個余分についた形の蛋白質の产生が期待できる。以上のようにして得られた、ベクターの大部分・C_n2部位遺伝子後半部分・C_n3部位遺伝子を含むEcoRI—SstⅡのDNA断片、C_n2部位遺伝子の一部を含むBstNI—SstⅡのDNA断片、及びベニシリナーゼ遺伝子シグナルペプチド領域とF_c領域遺伝子との連結部分に相当するEcoRI—BstNIのDNA断片とを混

合し、実施例5の方法に準じて、プラスミドpSEC-Fc（約4.7Kbp）を作成した。第12図にpSEC-Fcの作成方法を示す。

こうして得られたプラスミドpSEC-Fcを、実施例4の方法に準じて制限酵素HindⅢで切断する。一方、実施例17で得られたベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域を含むプラスミドpPS1を、実施例4の方法に準じて制限酵素HindⅢで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度5%）の後、ベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナル領域を含むHindⅢ—HindⅢのDNA断片（約210bp）をエレクトロエリューション法により回収する。このDNA断片を先に調製したプラスミドpSEC-Fcの制限酵素HindⅢ切断物と混合し、実施例17の方法に準じて、F_c領域遺伝子ベリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-Fcを作成した。第13図にpPS-Fcの作成方法を示した。

実施例19(F_c領域蛋白質の分泌発現確認)

前記実施例11で得られたF_c領域遺伝子団体内発現型プラスミドpFC362を有するエシエリヒア・コリC600株及び実施例18で得られたF_c領域遺伝子ベリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-Fcを有するエシエリヒア・コリHB101株を、最終濃度30μg/mlのアンビシリソウを含むLBGG培地（1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、0.1%グルコース、0.2%グリセロール（pH7.2））に接種し、37℃で24時間振とう培養を行なう。培養終了後、オスマティック・ショック法（C.Katoら、前出）により、培養物をベリプラズム面分と菌体内面分とに分画する。すなわち、遠心分離によって集めた菌体を生理食塩水で洗浄した後、1mM EDTAを含む25%ショ糖水溶液に懸濁させて、37℃で10分間振とうする。再び、遠心分離によって菌体を集め、菌体を氷冷した氷に懸濁させた後、4℃で10分間振とうする。この懸濁液に等量の0.1Mリン酸バッファー（pH7.0）を加えた後、遠心分離を行ない、菌体と分離した上清部分をベリプ

ラズム百分とする。一方、この菌体を0.05M リン酸バッファー (pH 7.0) に懸濁させ、超音波により菌体を破壊する。遠心分離によって菌体残渣を除去した上清部分を菌体内画分とした。

得られた画百分のサンプルは、アセトン乾燥を行なった後、Tris-HClバッファー (pH 6.8)、SDS、2-メルカブトエクノール、グリセロールを、それぞれ最終濃度60mM、2%、4%、10%になるように加えて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (鈴木、遠伝、31、43 (1977)) を行なった。分離用ゲルは12.5%とし、泳動バッファーは SDS-Tris-グリシン形 (U.K.Laemmli, Nature, 227, 680 (1970)) を用いた。電気泳動終了後、ゲル中の蛋白質を、25mM Tris-192mM グリシン (pH 8.3)-20% メタノールのバッファー中で、電気泳動的にニトロセルロース・フィルターに吸着させ、ウエスタン・ブロッティングを行なった。蛋白質を吸着させたニトロセルロース・フィルターを3%ゼラチンを含むTBSバッファー (20mM Tris

-HCl (pH 7.5)、500 mM NaCl) 中に60分間浸した後、一次抗体としてウサギ抗ヒトIgG-Fc成分抗血清 (カツベル) を用いた間接法で、ベルオキシダーゼ標識抗体を用いたイミニン・プロット・アッセイ・キット (バイオ・ラボ) により、ヒトIgG Fc領域蛋白質を特異的に染色した。結果の一部を複写して第14図に示した。この際に、後記参考例記載の方法により調製した既知量の天然型ヒトIgG Fc領域蛋白質も同一のSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動等を行なった。

第14図より、Fc領域遺伝子菌体内発現型プラスミドpFC362を有するエシェリヒア・コリC600株の場合には、Fc領域蛋白質は菌体内画分にのみ局在しているのに対して、ペリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-Fcを有するエシェリヒア・コリHB101株の場合にはペリプラズムまでFc領域蛋白質が分泌されていることがわかる。また、天然型Fc領域蛋白質にくらべ大腸菌産生Fc領域蛋白質の分子量が約5000ダルトン程

度小さいという第14図の結果から考えて、大腸菌産生Fc領域蛋白質には糖鎖の付加がおこっておらず、シグナルペプチドは除去されているものと思われる。

参考例 (天然型ヒト免疫グロブリンG Fc領域蛋白質の調製)

0.3 g のヒトIgG (シグマ)、17.5mg のシステイン、7.5mg のEDTA・2Na をPBSバッファー (100 mM リン酸バッファー (pH 7.4)、140 mM NaCl) に溶解し、150 μg のババイン (シグマ、タイプIV) を添加して、37°Cで7時間放置する。ババイン処理後のIgGを、PBSバッファーで平衡化したセファデックスG-200スーパー・ファイン・ゲル (ファルマシア) を用いた錯過カラムにかけ、ババイン処理によって生成したFc領域蛋白質及びFab領域蛋白質を、未反応のIgGと分離した。得られたFc領域蛋白質とFab領域蛋白質とを含む溶液を水に対して透析し、凍結乾燥によって濃縮した後、DE52・DEAEセルロース (ワットマン) を用いたイ

オン交換カラムにかけた。カラムを10mM リン酸バッファー (pH 7.4) で洗浄し、Fab領域蛋白質を完全に溶出させた後、NaCl濃度を0 mM から350 mM まで直接的に変化させた10 mM リン酸バッファー (pH 7.4) を用いて、Fc領域蛋白質を溶出させた。上記と同様にして透析、凍結乾燥を行ない、天然型ヒトIgG Fc領域蛋白質を取得した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ヒトIgG Fc領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミドpPS-FcのDNA塩基配列の一部と、それに対応する好アルカリ性バチルス#170株ベニシリナーゼ・シグナルペプチドとFc領域蛋白質のアミノ酸配列をしたものである。

第2図は、ヒトIgG遺伝子を含むファージ・クローン制限酵素切断点地図と、Fc領域遺伝子を含むサブクローンの制限酵素切断点地図を示したものである。

第3図は、C_m 3部位遺伝子を含むプラスミド

p F C 70 の作成方法を示したものであり、第4図は C_x 2 - C_x 3 部位遺伝子を含むプラスミド p F C 77 の作成方法を示したものである。

第5図、第6図、第7図はそれぞれ Fc 領域遺伝子団体内発現型プラスミド p F C 203、p F C 211、p F C 362 の作成方法を示したものである。

第8図は、プラスミド DNA の大腸菌からの分離・精製方法を示したものである。

第9図は、好アルカリ性バチルス No 170 ベニシリナーゼ遺伝子のクローニングの方法及びベニシリナーゼ遺伝子を有するプラスミド p E A P 1 及び p E A P 3 の作成方法を示したものである。

第10図は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ構造遺伝子を含むプラスミド p C M 71 の作成方法を示したものである。

第11図はベニシリナーゼ遺伝子プロモーター領域・シグナルペプチド領域を含むプラスミド p P S 1 の作成方法を示したものである。

第12図は、シグナルペプチド領域遺伝子との連結用ジョイントを有する Fc 領域遺伝子を含むブ

ラスミド p S E C - F C の作成方法を示したものである。

第13図は、Fc 領域遺伝子ペリプラズム分泌発現型プラスミド p P S - F C の作成方法を示したものである。

第14図は、Fc 領域蛋白質の分泌確認結果を示したものである。

代理人弁理士 有我重一郎
(外1名)

第1図の(1)

```

TTTAAACCCTAGAAAAATTCTACCCCTTTTCTTAATTACATAAAACTATGCCAAA
TGAACATGGAAACAAACATTTGAGATCAATTCTCTAATATACTCTAATAACTATTTAGC
TTGAAACAAAGGGTTCATAACATG-AAA-AAG-AAT-ACC-TTG-TTA-AAA-CTA-
MET-Lys-Lys-Ala-Thr-Leu-Leu-Lys-Val-
(1) GCA-TTA-TGT-GTA-ACT-TTA-CTA-GCA-ACA-ACT-CAA-TTT-GTT-ACC-
Gly-Leu-Cys-Val-Ser-Leu-Leu-Gly-Thr-Thr-Gln-Phe-Val-Ser-
Gly-Leu-Cys-Val-Ser-Leu-Leu-Gly-Thr-Thr-Gln-Phe-Val-Ser-
(2) ACC-ATT-TCT-TCT-GTA-CAA-CCT-TCA-ACA-TCC-CCA-CCC-TGC-CCA-
Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Gln-Ala-Ser-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-
GCA-CCT-GAA-CTC-CTG-GGG-GGA-CCG-TCA-GTC-TTC-CTC-110-TTC-CCC-
Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-
(30) CCA-AAA-CCC-AAG-GAC-ACC-CTC-ATC-ATC-TCC-CGG-ACC-CCT-GAG-
Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-MET-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-
(40) CTC-ACA-TCC-CTG-CTG-GAC-GTG-AGC-CAC-GAA-GAC-CCT-GAG-
Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-
(50) CTC-AAC-TTC-AAC-TGG-TAC-CTG-GAC-GGC-GTC-GAG-CTG-CAT-AAT-
Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-
(60) GCC-AAG-ACA-AAG-CCG-CCG-CAG-CAG-CAG-TAC-AAC-ACC-ACG-TAC-
Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-
(70) (80) (90) (100)

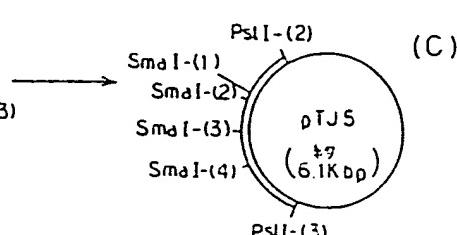
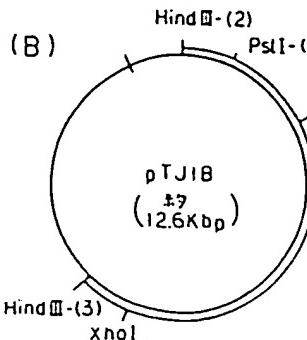
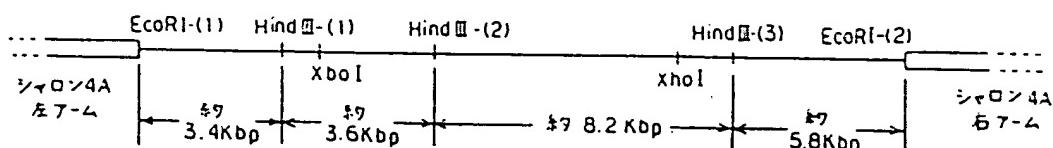
```

第 1 図 の (2)

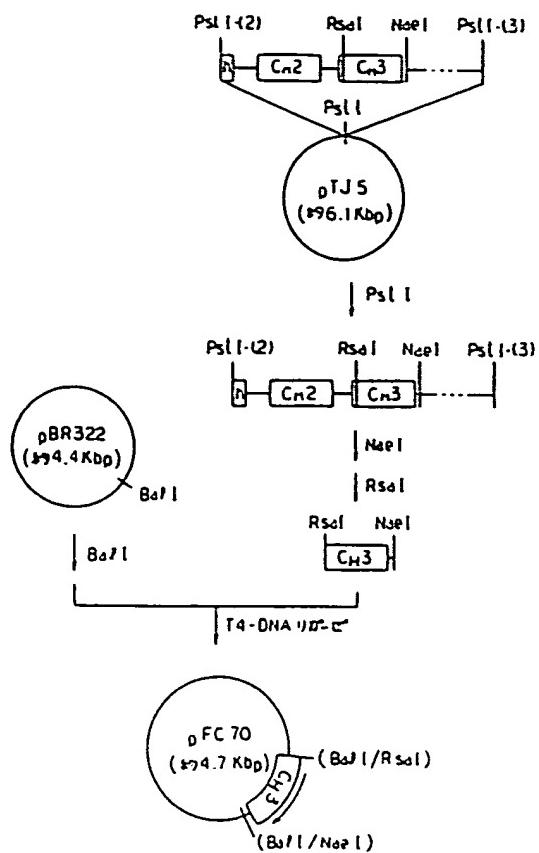
CCG-GTC-CTC-AGC-GTC-CTC-ACC-CTC-CTG-CAC-GAC-TGG-CTG-
 Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-
 (110) (120)
 AAT-GCC-AAC-GAG-TAC-AAC-TCC-AAG-GTC-TCC-AAC-AAA-CCC-CTC-
 Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-
 (130)
 CCA-GCC-CCC-ATC-GAC-AAA-ACC-ATC-TCC-AAA-GCC-AAA-GCC-CAG-
 Pro-Ala-Pro-Ile-Gly-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-
 (140)
 CCC-GGA-GAA-CCA-CAG-GTC-TAC-ACC-CTG-CCC-CCA-TCC-CCC-GAG-
 Phe-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Glu-
 (150) (160)
 GAC-ATG-ACC-AAG-AAC-CAC-GTC-AGC-CTG-ACC-TCC-CTG-GTC-AAA-
 Glu-MET-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-
 (170)
 GCC-TTC-TAT-CCC-ACC-GAC-ATC-GCC-CTC-GAG-TGG-GAG-ACC-AAT-
 Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Ala-
 (180) (190)
 GGG-CAG-CCC-GAC-AAC-AAC-TAC-AAG-ACC-ACC-CCT-CCC-GTC-CTG-
 Gly-Gln-Pro-Glu-Ala-Asn-Thr-Lys-Tyr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-
 (200)
 GAC-TCC-GAC-GCC-TCC-TTC-CTC-TAT-AGC-AAG-GTC-ACC-CTG-
 Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-
 (210)
 GAC-AAC-ACC-ACC-TCC-CAC-CAC-GCC-AAC-GTC-TTC-TCA-TCC-TCC-
 (220) Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-Ala-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-
 (230)
 CTC-ATG-CAT-GAC-GCT-CTG-CAC-AAC-CAC-TAC-ACG-CAC-AAG-ACC-
 Val-MET-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-
 (240)
 CTC-TCC-CTC-TCC-CCC-CGT-AAA-TAAATACCATCC
 Leu-Ser-Lys-Ser-Pro-Gly-Lys
 (250)

第 2 図

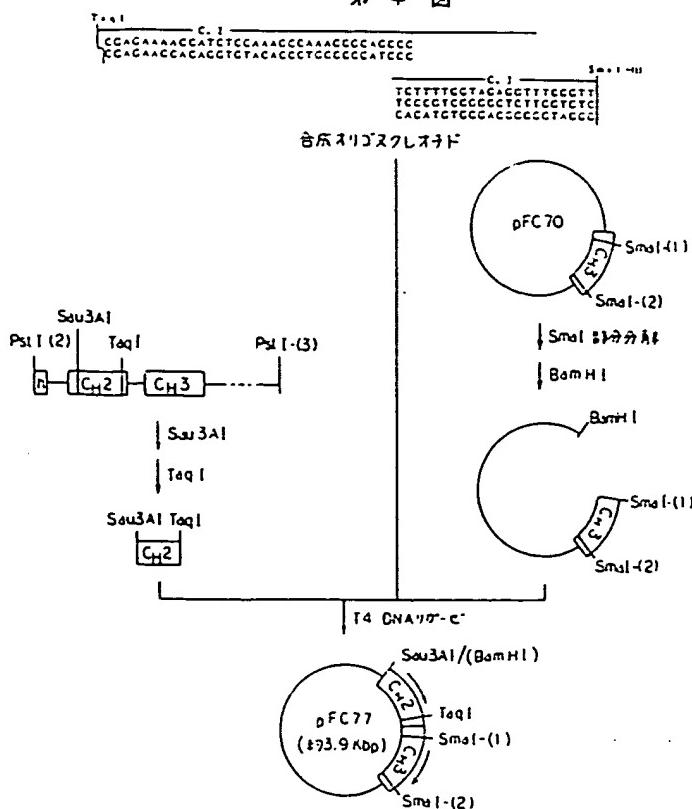
(A)



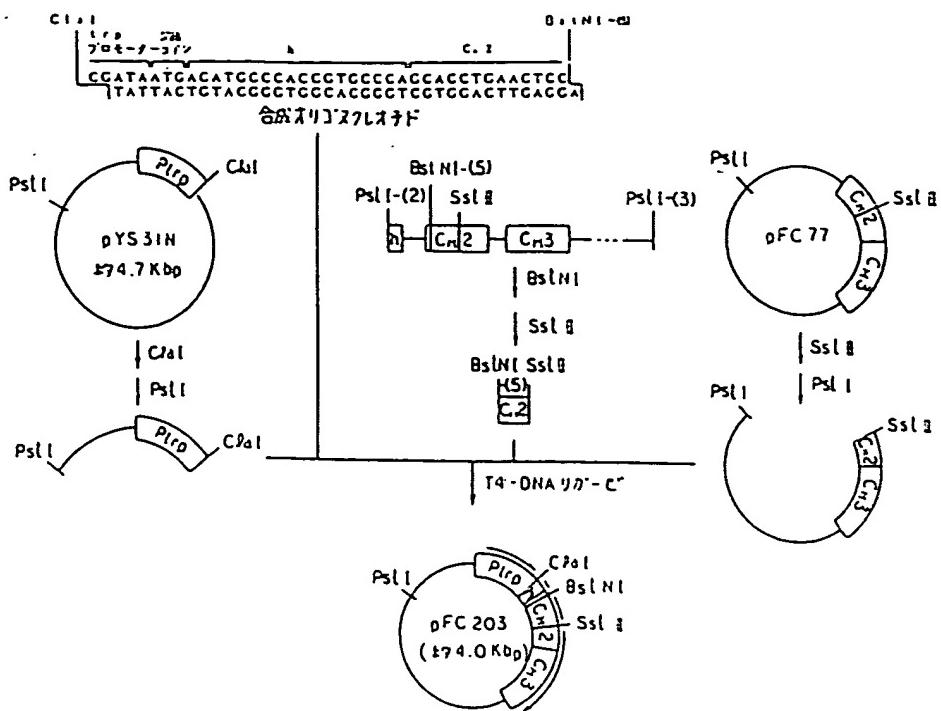
第3回



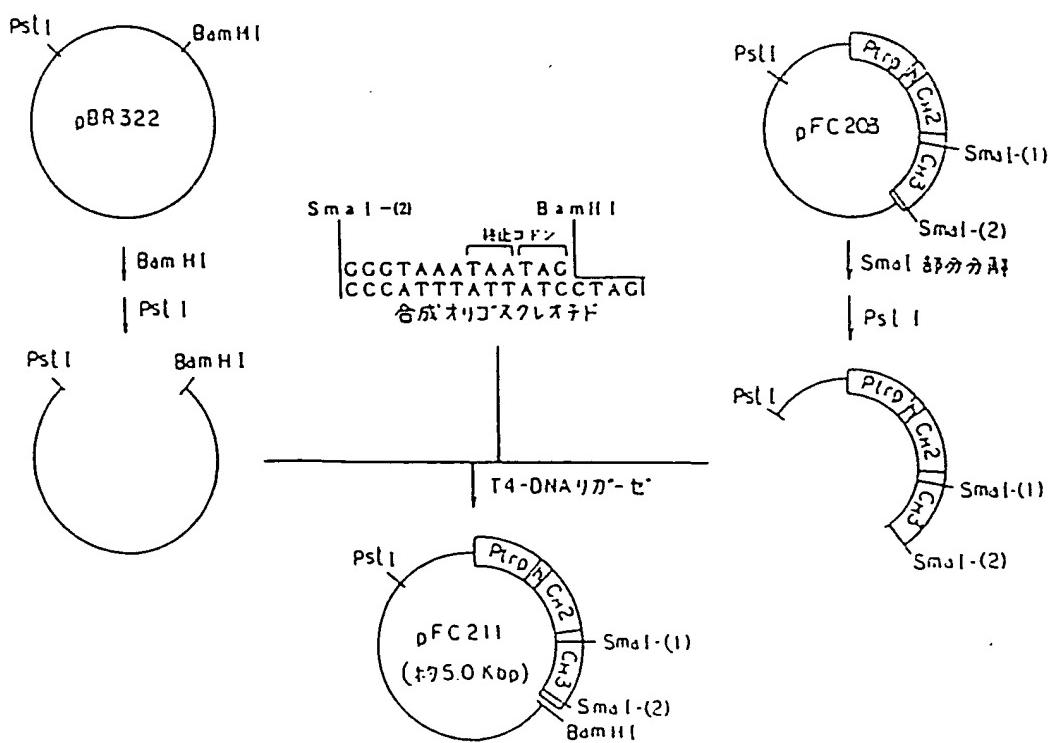
第 4 頁



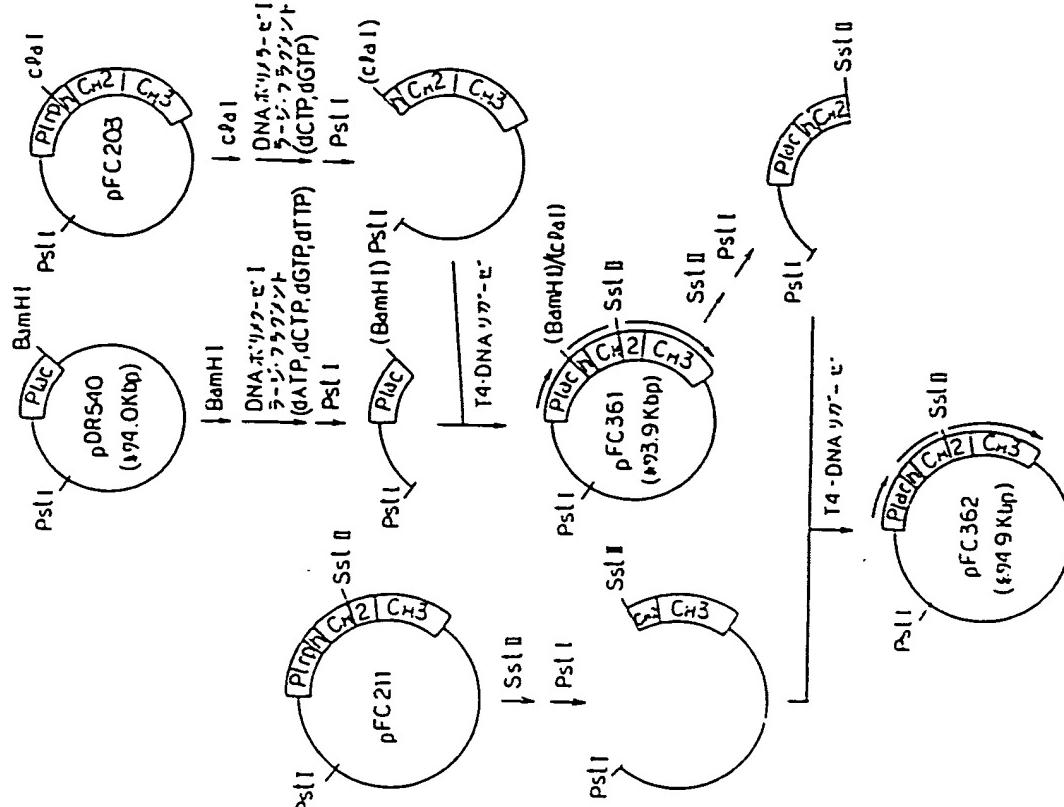
第5図



第6図



第 8 図



第 8 図 の (2)

第 8 図 の (1)

固体

10mL、20% シュウ酸、50mM Tris-HCl
(pH 8.0)、1mM EDTA、懸濁、水浴上
50mL ポリプロピレン製遠心管
2mL、0.25M EDTA
1mL、リゾチーム (5mg/mL, 0.025M
Tris-HCl (pH 8))
0.1mL、リボスクリアーゼ A (10mg/mL)

混 合 ゆるやかに混合、水浴上15分~30分放置。
5mL、3×トリトン X-100、ゆるやかに

混合、
水浴上15分~45分放置。

遠心分離 17,000r.p.m. 4°C、40分
上澄液
250mLガラスびん

2/3倍容量の蒸留水 (2回蒸留)
2/3倍容量の冷たい水飽和フェノール、ゆる
やかに混合。

遠心分離 6,500r.p.m. 4°C、15分

上層

等量のフェノール:クロロホルム

遠心分離 6,500r.p.m. 4°C、15分

上層

1/25倍容量の 5M NaCl
2倍容量のエタノール、-20°Cで1晩放置

遠心分離 6,500r.p.m. -20°C、60分

DNAベレット、過剰の液体を乾燥

5mL A-50バッファーに再溶解

1mL 酢酸80%グリセロール、ゆるやかに混合

A-50カラム (2×35cm, 1フラクション
= 4mL)

DNA分離 (A...ビーグル)

2倍容量のエタノール、-20°Cで1晩放置

第 8 圖 a (3)

遠心分離 6500r.p.m. - 20℃. 60分

DNAペレット

2.1 mL TENバッファ - (20mM Tris - HC_l (pH7.5), 50mM NaCl, 1mM EDTA) (5mL酵母セルロース管)

2.2 g 塩化セシウム混合
(培養瓶に保持)

150 μL Pbl (2mg/mL) よく混合する。

E・E・ラジオント運営会社 15,000円

| 20 E - 401\$ E

UVで該葉上方バンド：葉色体ニックDNA
下方バンド：共有結合した間接状プラスマチドDNA

下在バンドのDNAを調査 結論

225×2350W= X 日立エレクトリック (UYT 搭載)

九五指掌心经图

第 8 図 の (4)

透析 (10 mM Tris - HCl 2 (pH 8.0), 1 M

M EDTA、2~4%、4℃ 一袋)

30m² コルテックス遮心音

1 / 25 倍容量の 5 M NaCl

2倍容量のエタノール、-20℃で一晩放置

遠心分離 6,500r.p.m. -20℃、60分

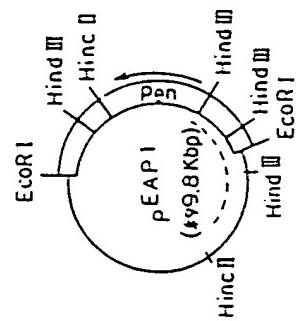
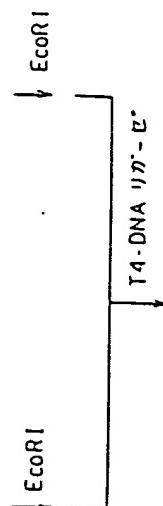
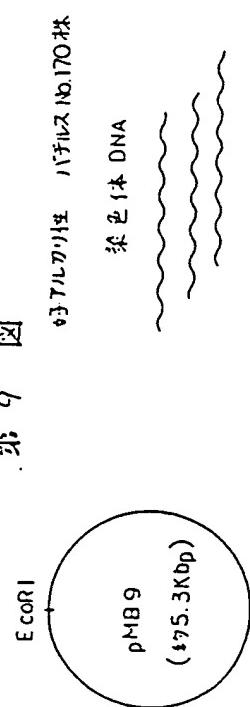
DNA达基

1 ~ 2 m² TEN バッフル -

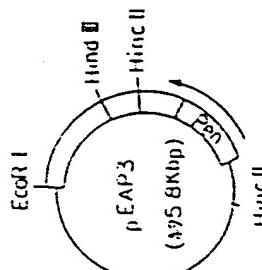
細胞プラスミドDNA (1 μg/培養物) E3

- 20 ~ - 70 てて貯蔵

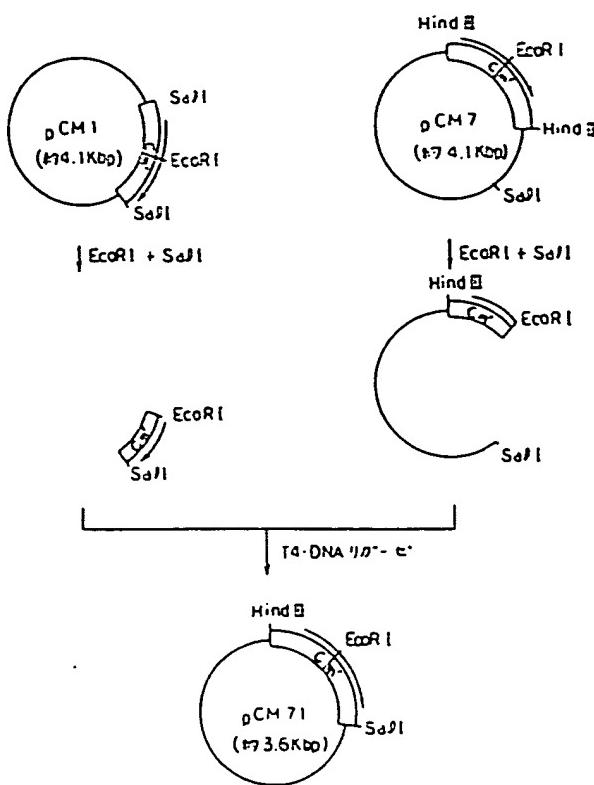
卷 9



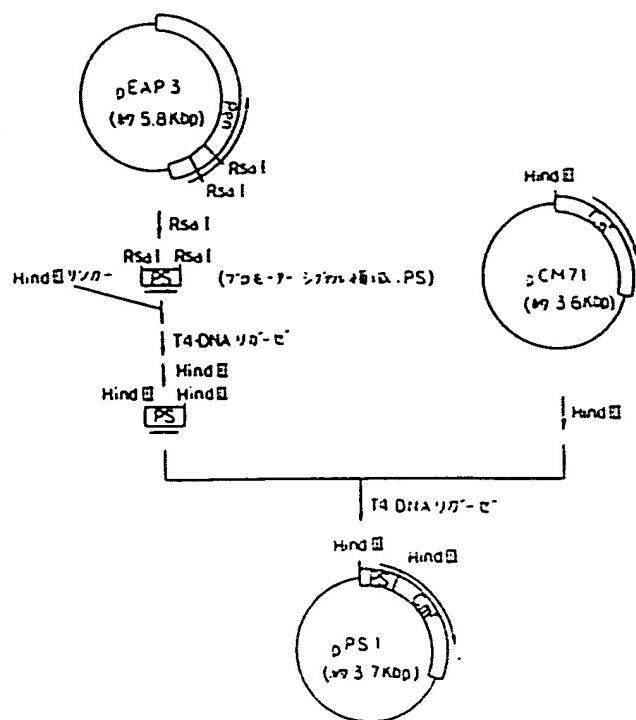
→ 44 KDP 自然脱治
(-----)



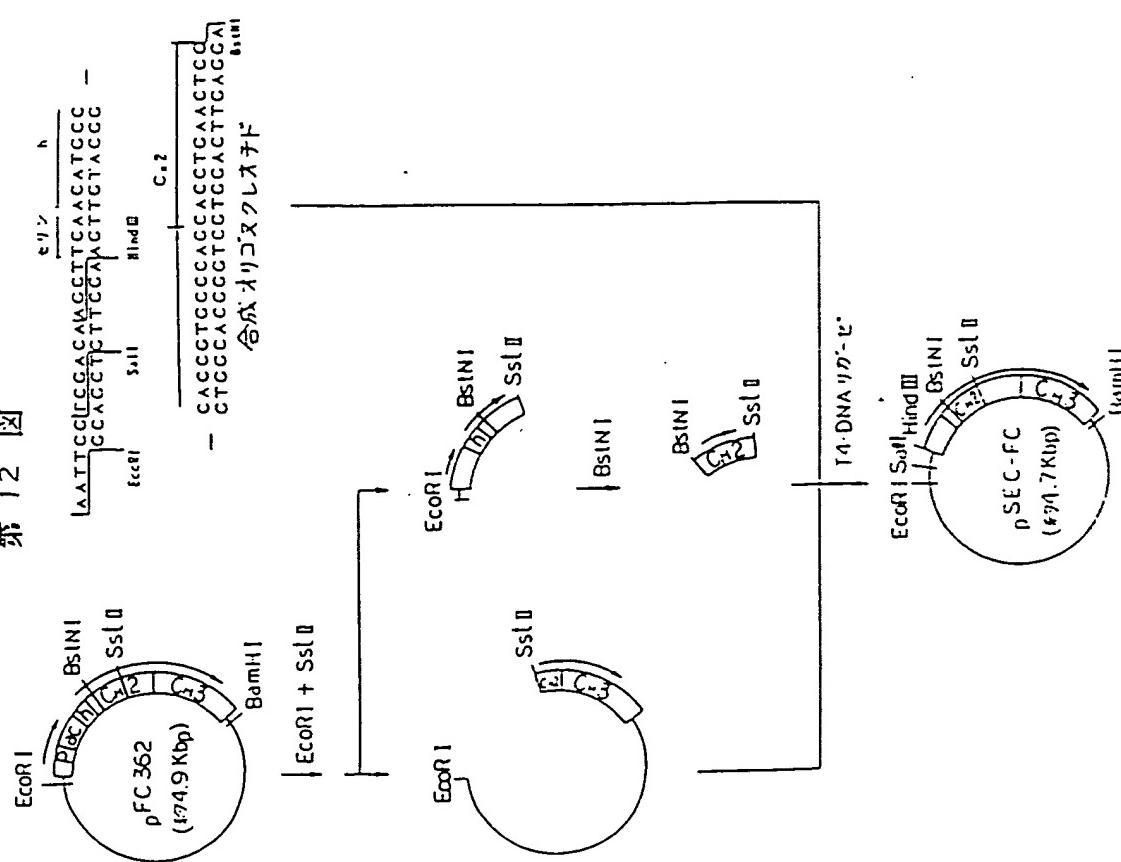
第10図



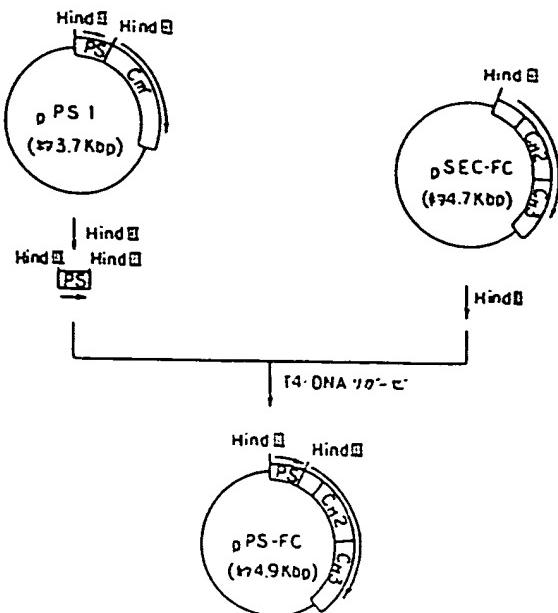
第11図



第12図

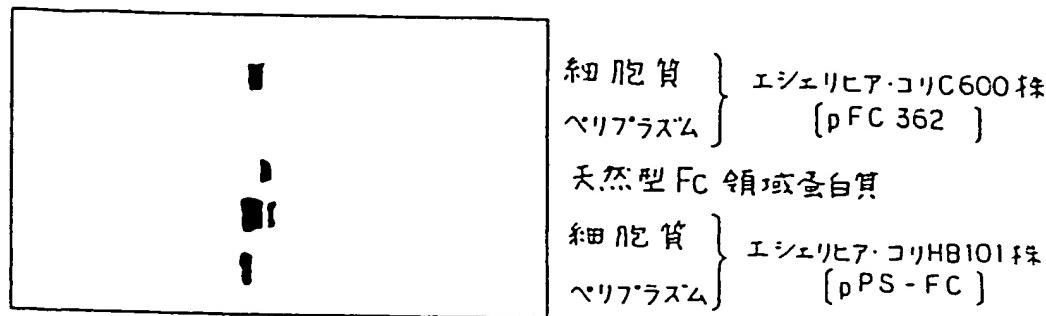


第13図



図面の净書(内容に変更なし)

第14図



手続補正書(方式)

昭和61年6月9日

特許庁長官 宇賀道郎 殿



1. 事件の表示

特願昭61-43530号

2. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫
グロブリンG Fc領域蛋白質の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

名称 (679) 理化学研究所 (外1名)

4. 代理人 〒151

住所 東京都渋谷区代々木2丁目6番9号

第2田中ビル

氏名 弁理士 (7260) 有我重一郎

電話 370-2470

方式 61.6.15
二

手続補正書(自発)

昭和61年8月13日

特許庁長官 宇賀道郎 殿



1. 事件の表示

特願昭61-43530号

2. 発明の名称

新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫
グロブリンG Fc領域蛋白質の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

名称 (679) 理化学研究所 (外1名)

4. 代理人 〒151

住所 東京都渋谷区代々木2丁目6番9号

第2田中ビル

氏名 弁理士 (7260) 有我重一郎

61.8.15
二

5. 補正命令の日付(発送日)

昭和61年5月7日

(発送日:昭和61年5月27日)

6. 補正の対象

図面。

7. 補正の内容

第14図を別紙の通り鮮明に描いたものに補正する(内容に変更なし)。

以上

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄および図面。

6. 補正の内容

- (1) 明細書第15頁第9行目に「...プロモーター等かあげられるが」とあるのを、「...プロモーター等があげられるが」と補正する。
- (2) 同第15頁第20行目に「作成できる団体内発現型」とあるのを、「作成できる。団体内発現型」と補正する。
- (3) 同第19頁第9行目に「用いられる」とあるのを、「用いられる。」と補正する。
- (4) 同第22頁第11行目に「炭素源空素源」とあるのを、「炭素源、空素源」と補正する。
- (5) 同第22頁第18行目に「機能させるも目的で、」とあるのを、「機能させる目的で、」と補正する。
- (6) 同第24頁第9行目に「Alg」とあるのを、「Arg」と補正する。
- (7) 同第26頁第17行目に「連結を行い」とあるのを、「連結を行ない」と補正する。

- (8) 同第28頁第7行目から第8行目に「B a m H I」とあるのを、「B a m H I」と補正する。
- (9) 同第28頁第20行目に「ベセスグ」とあるのを、「ベセスグ」と補正する。
- (10) 同第40頁第9行目に「C x 2」とあるのを、「C. 2」と補正する。
- (11) 同第49頁第11行目に「ベゼセスグ」とあるのを、「ベゼスダ」と補正する。
- (12) 同第50頁第10行目に「第10図」とあるのを、「第8図」と補正する。
- (13) 同第51頁第15行目に「第10図」とあるのを、「第8図」と補正する。
- (14) 同第57頁第2行目に「E C - F C」とあるのを、「E C - F C」と補正する。
- (15) 同第57頁第4行目に「p S E C F C」とあるのを、「p S E C - F C」と補正する。
- (16) 同第59頁第12行目に「グリシン形」とあるのを、「グリシン系」と補正する。
- (17) 同第60頁第3行目から第4行目に「(カッペル)」を用いた間接法で、ペルオキシダーゼ標識抗

体を」とあるのを、「(カッペル)を用いた間接法で、ペルオキシダーゼ標識抗体を」と補正する。

(18) 同第60頁第5行目から第6行目に「バイオ・ラッド」とあるのを、「バイオ・ラッド」と補正する。

(19) 明細書に添付した第1図の(1)、第1図の(2)、第4図、第5図、第7図および第12図を別紙の通り補正する。

以上

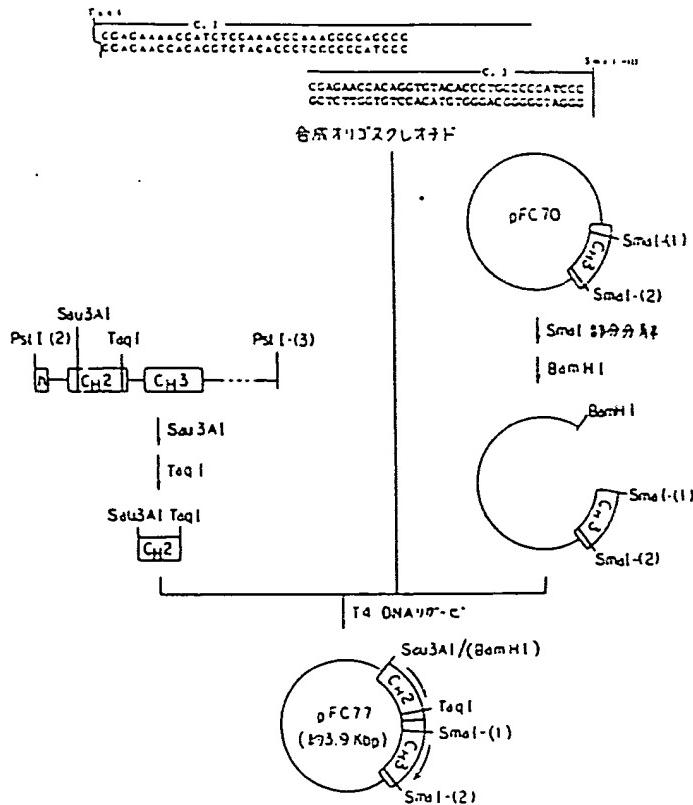
第1図の(1)

ACGCTTTTGTAAATTACATAAAACTATCCAAA
 TCAAGATGGAACAAACATTTGACATGAATTCTCTAATATACTAATAACTATTTAGC
 TTCAAAAGAAAGGCTTGATAACATG-AAA-AAC-AAT-ACC-TTC-TTA-AAA-GTA-
 MET-Lys-Lys-Asn-Thr-Leu-Leu-Lys-Val-
 GGA-TTA-TCT-CTA-AGT-TTA-CTA-CCA-ACA-ACT-CAA-TTT-GTT-ACC-
 Gly-Leu-Cys-Val-Ser-Leu-Leu-Gly-Thr-Thr-Gln-Phe-Val-Ser-
 CGA-ATT-TCT-TCT-CTA-CAA-CCT-TCA-ACA-TGC-CCG-TCC-CCA-
 Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Gln-Ala-Ser-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-
 CCA-CCT-GAA-CTC-CTG-GGG-GGA-CCG-TCA-CTC-TTC-CTC-TTC-CCC-
 Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-
 CCA-AAA-CCC-AAG-GAC-ACC-CTC-ATC-ATC-TCC-CCG-ACC-CCT-GAG-
 Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-MET-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-
 CTC-ACA-TCC-CTG-GTC-GTC-GAC-CTG-GAC-CAC-GAA-GAC-CCT-GAG-
 Val-Thr-Cys-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-
 CTC-AAG-TTC-AAC-CTG-TAC-CTG-GAC-GCC-CTG-GAG-CTG-CAT-AAT-
 Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-
 GCC-AAG-ACA-AAG-CCG-CCC-GAC-GAC-CAC-TAC-AAC-ACC-ACC-TAC-
 Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-
 (100)

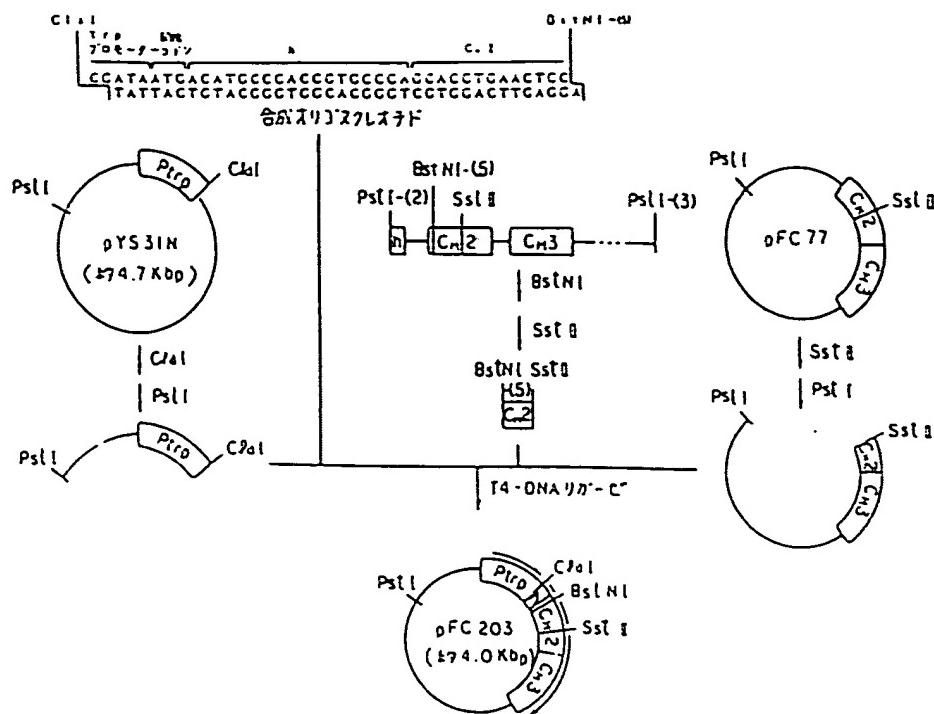
第1図の(2)

CCC-CTC-CTC-ACC-GTC-CTC-ACC-CTC-CTC-CAC-CAC-GAC-TGG-CTC-
 Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Lys-Leu-
 AAT-GCC-AAC-CAG-TAC-AAG-TGC-AAG-GTC-TCC-AAC-AAA-GCC-CTC-
 Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Ser-Ser-Ala-Lys-Ala-Leu-
 CCA-GCC-CCC-ATC-GAG-AAA-ACC-ATC-TCC-AAA-GCC-AAA-GGG-CAG-
 Pro-Ala-Pro-Ile-Gly-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-
 CCC-GGA-GAA-CCA-CAG-GTC-TAC-ACC-CTG-CCC-CCA-TCC-CCC-GAG-
 Phe-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Ser-Arg-Glu-
 GAG-ATG-ACC-AAG-AAC-CAG-GTC-AGC-CTG-ACC-TGC-CTG-GTC-AAA-
 Glu-MET-Thr-Lys-Ala-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-
 CCC-TTC-TAT-CCC-AGC-GAC-ATC-GCC-GTC-GAG-TGG-GAG-ACC-AAT-
 Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-
 CCC-CAG-CCG-GAG-AAC-AAC-TAC-AAG-ACC-ACC-CCT-CCC-CTG-CTG-
 Glu-Gln-Pro-Glu-Ala-Ala-Thr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-
 GAC-TCC-GAC-GCC-TCC-TTC-CTC-TAT-ACC-AAG-CTC-ACC-CTG-
 Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-
 GAC-AAG-AGC-AGC-TCG-CAC-CAG-GCC-AAC-CTC-TTC-TCA-TCC-
 Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-Ala-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-
 CTC-ATG-CAT-GAC-GCT-CTG-CAC-AAC-CAC-TAC-ACC-CAG-AAG-ACC-
 Val-MET-His-Glu-Ala-Leu-His-Ala-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-
 CTC-TCC-CTC-TCC-CCC-GGT-AAA-TAATACCATCC
 Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys

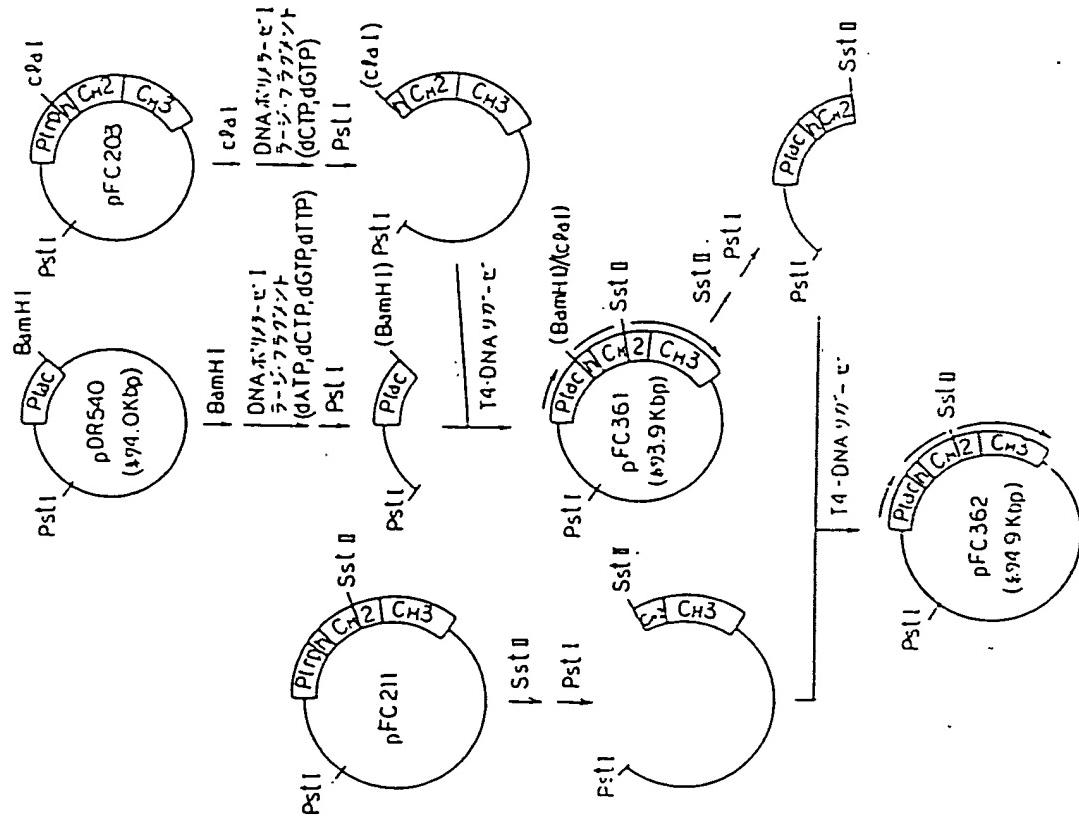
第4図



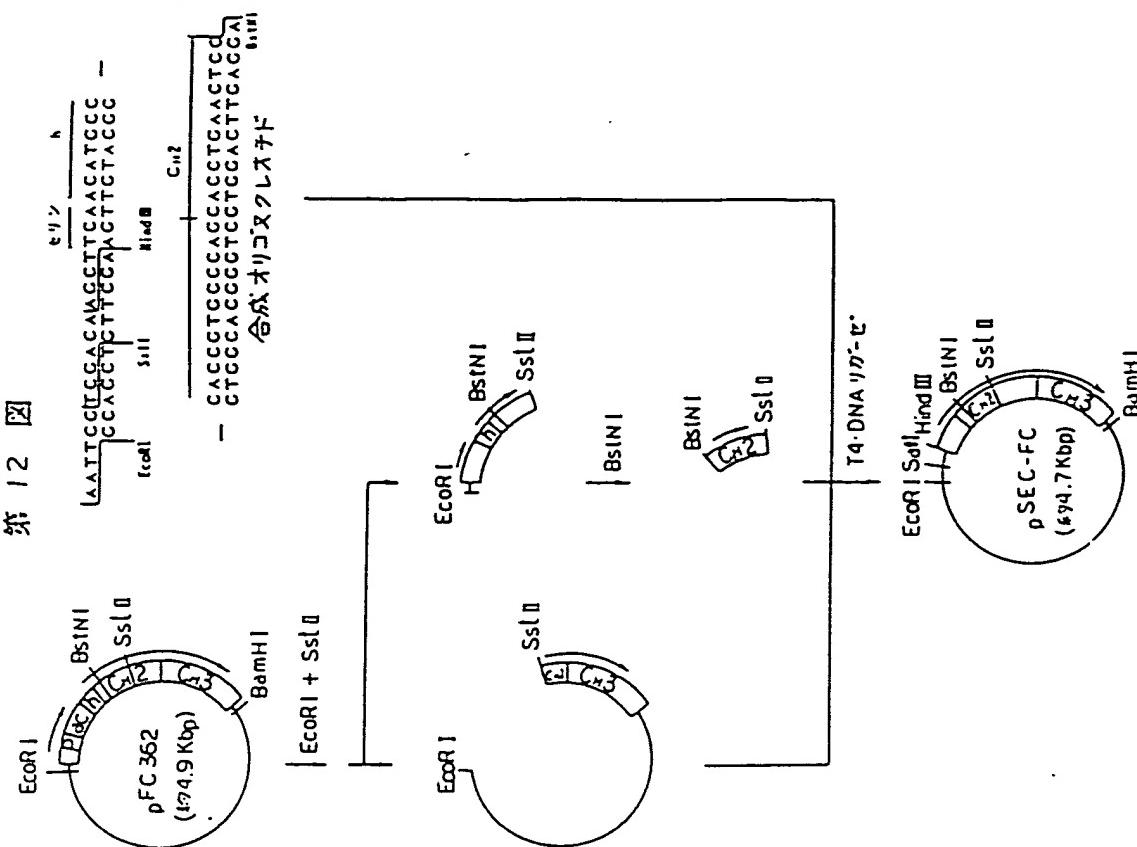
第5図



第7図



第 12 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.